



Université de Sherbrooke

**Méthode d'identification de partenaires protéiques des récepteurs opioïdes mu et delta**

Par

Alexandre Bergeron

Programme de Pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la  
santé en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

en Pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada

29 Janvier 2021

Membres du jury d'évaluation

Louis Gendron PhD

Programme de pharmacologie ; Directeur de recherche

Mannix Auger-Messier PhD

Programme de pharmacologie ; Évaluateur interne

François-Michel Boisvert PhD

Programme de biologie cellulaire ; Évaluateur externe

© Alexandre Bergeron, 2021

## RÉSUMÉ

### Méthode d'identification de partenaires protéiques des récepteurs opioïdes mu et delta

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Québec, Canada  
J1H5N4

Mots clés : douleur, opioïde, APEX2, partenaires intracellulaires, CNIH4

Les opioïdes forment la classe d'analgésiques la plus utilisée en clinique à l'heure actuelle pour traiter les douleurs modérées à sévères. En dépit de leur bon profil analgésique, l'utilisation d'opioïdes entraîne un certain nombre d'effets délétères tels que la constipation, la tolérance et la dépression respiratoire. Des trois types de récepteurs aux opioïdes (mu, delta, kappa), le récepteur mu est de loin celui le plus ciblé par les médicaments antidouleurs formant, à l'heure actuelle, la pharmacopée clinique. Bien qu'ils soient très utilisés en clinique, les opioïdes activent plusieurs voies de signalisation encore mal comprises à ce jour.

Pour bien comprendre la signalisation d'un récepteur, il est primordial de pouvoir définir 3 paramètres biologiques importants, soit le « quoi », le « où » et le « quand ». Définir ces trois paramètres permet une résolution moléculaire des différents partenaires d'interaction impliqués dans un processus biologique. Les techniques d'identification de partenaires protéiques échouent bien souvent à définir simultanément la résolution spatiale et temporelle des interactions identifiées. Parmi les différentes techniques permettant de pallier ces lacunes, la technique d'identification par biotinylation de proximité gagne en popularité. Nous avons donc utilisé la technologie APEX2, jumelée à la spectrométrie de masse, afin d'interroger les partenaires d'interactions impliqués dans la signalisation des récepteurs opioïdes mu et delta, et ce, dans leurs états basaux et à la suite de leur stimulation par un agoniste. Nous avons montré qu'il était possible d'employer cette méthode afin d'identifier plusieurs protéines impliquées dans une multitude de processus cellulaires, notamment l'adressage des récepteurs. Nous avons ensuite validé nos résultats en confirmant l'interaction de certaines des protéines identifiées par co-immunoprécipitation, dont la protéine CNIH4, une protéine faisant le sujet de plus en plus d'études et qui pourrait avoir un rôle dans l'expression de certains GPCR à la membrane plasmique.

# Table des matières

<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>ii</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>iii</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>vi</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>viii</b>
<b>1 Introduction .....</b>	<b>9</b>
1.1 La douleur .....	9
1.1.1 Définition et classification de la douleur .....	9
1.1.2 Impact de la douleur sur la société.....	10
1.1.3 Nociception.....	11
1.1.4 Traitement de la douleur .....	12
1.2 Les opioïdes .....	13
1.2.1 Les récepteurs aux opioïdes .....	14
1.2.2 Les récepteurs couplés aux protéines G .....	15
1.2.3 Le récepteur opioïde mu .....	17
1.2.4 Le récepteur opioïde delta .....	18
1.3 Signalisation des récepteurs opioïdes .....	18
1.3.1 Activation des protéines G effectrices .....	18
1.3.2 Adénylatecyclase .....	19
1.3.3 La phospholipase C.....	20
1.3.4 Les canaux ioniques.....	21
1.3.4.1 Les canaux potassiques à rectification entrante de la famille Kir3 .....	21
1.3.4.2 Les canaux calciques voltage-dépendants.....	21
1.3.5 Les protéines kinases activées par des mitogènes.....	22
1.3.6 Activité constitutive.....	22
1.3.7 Trafic intracellulaire .....	23
1.3.8 Biais de signalisation.....	23
1.3.9 Oligomérisation des récepteurs opioïdes .....	24
1.4 Projet : Identification de partenaires protéiques potentiels des récepteurs opioïdes mu et delta par APEX2.....	24
1.4.1 Outils d'identification de partenaires protéiques .....	25

1.4.2	Co-immunoprécipitation .....	25
1.4.3	Pull-down .....	26
1.4.4	Transfert de protéines d'étiquettes.....	26
1.4.5	Biotinylation de proximité par APEX2 .....	27
1.5	But de l'étude, objectifs et hypothèses .....	30
<b>2</b>	<b>Matériel et Méthodes .....</b>	<b>33</b>
2.1	Culture Cellulaire.....	33
2.1.1	Mise en culture et passage des différents types de cellules.....	33
2.1.2	Réalisation des lignées stables NG108-15 .....	34
2.1.3	Transfection .....	34
2.2	Immunobuvardage et co-immunoprécipitation .....	35
2.2.1	Récolte des cellules, extraction des protéines et immunoprécipitation.....	35
2.2.2	Immunobuvardage .....	35
2.3	Essais de MAPK.....	36
2.4	Biotinylation APEX2.....	37
2.5	Spectrométrie de masse (LC-MS/MS) .....	38
2.6	Analyse bioinformatique .....	38
2.7	Transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET) .....	40
<b>3</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>41</b>
3.1	Caractérisation des constructions chimères .....	41
3.2	Génération de lignées cellulaires NG108-15 stables .....	49
3.3	Identification de partenaires d'interactions potentiels des récepteurs DOP et MOP par spectrométrie de masse.....	51
3.4	Les sous-unités COP $\beta$ 1 et COP $\beta$ 2 de COPI interagissent avec DOP dans des cellules HEK293 .....	55
<b>4</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>58</b>
4.1	Caractérisation des récepteurs FMA et FDA .....	62
4.1.1	Expression des constructions .....	62
4.1.2	Fonctionnalité des récepteurs .....	63
4.1.3	Fonctionnalité d'APEX2.....	63
4.1.4	Détection de nouveaux partenaires d'interactions potentiels de DOP et MOP par la méthode APEX2.....	64
4.2	Validation de la technique .....	65
4.3	Confirmation des partenaires d'interaction COP $\beta$ 1/ COP $\beta$ 2 par co-immunoprécipitation .....	66

4.4	Comparaison des résultats de spectrométrie de masse avec ceux des professeurs Mark Von Zastrow et Nevan J Krogan .....	68
4.5	Identification du partenaire d'interaction potentiel CNIH4 .....	69
5	<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>71</b>
6	<b>Annexes .....</b>	<b>76</b>
7	<b>Bibliographie.....</b>	<b>77</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Représentation schématique de la technologie d'étiquetage de proximité. ....	29
<b>Figure 2:</b> Représentation schématique des constructions Flag MOP-APEX2 et Flag DOP-APEX2. Les constructions ne sont pas à l'échelle.....	32
<b>Figure 3:</b> Représentation schématique illustrant le continuum technique d'identification des partenaires protéiques avec APEX2.....	40
<b>Figure 4:</b> Vérification de l'expression des différentes constructions APEX2 par immunobuvardage.....	42
<b>Figure 5:</b> Activation de la voie des MAPK lors de la stimulation des constructions FD, FDA, FM et FMA. ....	45
<b>Figure 6:</b> La biotinylation des protéines à proximité des récepteurs opioïdes mu et delta par APEX2 dépend du peroxyde d'hydrogène. ....	47
<b>Figure 7:</b> La biotinylation des protéines à proximité des récepteurs opioïdes mu et delta dépend de la présence de biotine-phénol.....	48
<b>Figure 8:</b> Identification de clones positifs pour les constructions FDA et FMA par immunoprécipitation. ....	50
<b>Figure 9:</b> Comparaison des protéines identifiées par APEX 2 et LC-MS/MS avec les protéomes des récepteurs opioïdes mu et delta tels que défini par les bases de données BioGRID et Bioplex. ....	52
<b>Figure 10:</b> La protéine COPβ2 interagit avec DOP par Co-Immunoprécipitation dans des cellules HEK293 transfectées de façon transitoire. ....	55
<b>Figure 11:</b> La protéine COPβ1 interagit avec le DOP par Co-Immunoprécipitation dans des cellules HEK293 transfectées de façon transitoire. ....	56
<b>Figure 12:</b> La protéine CNIH4 interagit avec le récepteur delta par Co-Immunoprécipitation dans des cellules HEK293 transfectées de façon transitoire.. ....	57
<b>Figure 13:</b> La protéine CNIH4 interagit avec le récepteur delta par Co-Immunoprécipitation dans des cellules HEK293 transfectées de façon transitoire... ..	57

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Nombre de clones totaux des différentes constructions stables pour les lignées cellulaires NG108-15 .....	49
<b>Tableau 2:</b> Validation de la technique d'identification par APEX 2 de partenaires protéiques connus des récepteurs opioïdes mu et delta. ....	52
<b>Tableau 3:</b> Partenaires potentiels des récepteurs MOP et DOP identifiés par spectrométrie de masse .....	54



## Liste des abréviations

BRET	Transfert d'énergie de résonance de bioluminescence
Co-IP	Co-immunoprécipitation
COPI	<i>Coatomer complex I</i>
DOP	Récepteur opioïde delta
MOP	Récepteur opioïde mu
KOP	Récepteur opioïde kappa
HEK293	<i>Human embryonic kidney cells</i>
IASP	Association internationale pour l'étude de la douleur
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
AMP	Adenosine monophosphate
GEF	<i>Guanine exchange factors</i>
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
PKA	Protéine kinase A
AC	Adénylate cyclase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
CNIH4	<i>Cornichon Family AMPA Receptor Auxiliary Protein 4</i>
NOP	Récepteur de la nociceptine

# 1 Introduction

## 1.1 La douleur

### 1.1.1 Définition et classification de la douleur

La douleur est un concept complexe et très nuancé sur lequel nous ne cessons d'en apprendre davantage. En effet, bien que la douleur fasse le sujet d'un très grand nombre d'études chaque année, sa définition a été révisée en 2020, à la suite d'un processus s'étalant sur 2 ans, afin de mieux refléter sa complexité et toutes ses facettes. Selon l'Association Internationale de l'Étude sur la Douleur (IASP), la douleur est définie comme étant « Une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée ou ressemblant à celle associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle. » (IASP 2020 ; Srinivasa N., et al. 2020).

La douleur est une expérience personnelle très hétérogène, nécessitant une classification complexe basée sur des approches multimodales. L'IASP, en collaboration avec l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), a développé un système de classification des douleurs chroniques et aiguës, facilitant le choix de traitement (Finnerup, 2019; Orr et al., 2017).

Lorsqu'applicable, la composante anatomique de classification de la douleur est bien la première utilisée. On essaie alors de trouver l'emplacement de la douleur, prodiguant de l'information très utile pour son évaluation et son traitement.

Le système de classification de la douleur basé sur l'étiologie décrit le facteur causal de la douleur. Il permet de distinguer différentes composantes de la douleur, par exemple malin ou non malin faisant référence à la nature potentiellement cancéreuse de la douleur ressentie. Ce système permet parfois de déterminer l'affection sous-jacente à la douleur.

L'intensité de la douleur est habituellement déterminée à l'aide d'outils comme l'échelle de douleur Wong-Baker, une échelle de numérotation de la douleur ou encore une échelle verbale d'intensité, permettant la quantification ou la qualification de la douleur en question.

Finalement, le système de classification de la douleur basée sur la durée permet la distinction entre différentes catégories de douleurs ; aiguë, chronique et épisodique. Généralement, une douleur persistant plus de 3 à 6 mois marquera la transition entre une

douleur de type aiguë à une douleur de type chronique, alors qu'une douleur survenant par épisodes, et non présente entre ceux-ci sera qualifiée d'épisodique (Chekka & Benzon, 2018).

Bien que parfois désagréable, la douleur joue un rôle vital au sein d'un organisme en tant que mécanisme de protection. Dans le cas d'une douleur aiguë, elle sera perçue par l'organisme comme un signal d'alarme, lui indiquant une insulte mécanique, chimique ou thermique et permettant ainsi à l'organisme de se préparer à faire face à l'insulte. En dépit de son rôle critique de protection de l'organisme, la douleur peut parfois évoluer et devenir néfaste. Par exemple, dans le cas de la douleur chronique, la douleur est récurrente et persiste au-delà du temps de guérison normal de l'insulte, menant à une diminution de la qualité de vie sans effet bénéfique de celle-ci.

Lorsque combinés, ces systèmes de classification de la douleur permettent une meilleure compréhension et classement de la douleur. Ceux-ci offrent donc la possibilité de rediriger les différents types de douleurs vers les traitements les plus adaptés pour le cas en question (Trouvin & Perrot, 2019) et ainsi diminuer les impacts de la douleur sur la société.

### 1.1.2 Impact de la douleur sur la société

La douleur, notamment la douleur chronique, est un réel problème et engendre des conséquences sociétales profondes. En 2016, la douleur ainsi que les maladies liées à celle-ci constituaient la cause mondiale principale d'incapacité au travail. Mondialement, le fardeau causé par la douleur chronique est en hausse constante, avec près de 2 milliards de personnes en étant atteint (Mills et al., 2019). En 2016 aux États-Unis, approximativement 50 millions de personnes souffraient de douleur chronique, et environ 8 millions parmi ceux-ci rapportaient une douleur chronique ayant des impacts sévères sur leur qualité de vie personnelle, sociale et au travail (Dahlhamer, 2018). La prévalence de la douleur chronique est similaire au Canada, avec des statistiques rapportant 1 Canadien sur 5 (20% de la population) souffrant de douleur chronique (Canada, 2019). Bien qu'il existe moins de données au Canada, aux États-Unis, les coûts annuels totaux associés à la douleur chronique, incluant les coûts de perte de productivité, ont été estimés à 560 milliards de dollars. Si on applique ces estimations au prorata de la population canadienne, les coûts

directs et indirects combinés estimés de la douleur chronique totaliseraient entre 56 à 60 milliards de dollars par année (Wilson et al., 2015). En 2016, le fardeau économique canadien associé à la douleur chronique atteignait plus de 7,2 milliards de dollars par année (Hogan et al., 2016). Dans cette étude, seuls les frais de santé directs ont été examinés et donc les dépenses payées par les individus ainsi que les coûts de perte de productivité ne se sont pas reflétés, soulignant les coûts faramineux engendrés par la douleur. Somme toute, la douleur est un enjeu sociétal important avec plusieurs ramifications et de très grandes répercussions justifiant la recherche qui lui est consacrée afin de mieux la comprendre et, ultimement, mieux la traiter.

### 1.1.3 Nociception

Bien que souvent confondus, il est important de bien différencier la douleur de la nociception. La nociception fait référence au traitement de l'information, interne et/ou externe, telle que générée par l'activation de fibres nerveuses périphériques appelées nocicepteurs, par le système nerveux périphérique et central (Animals, 2009). Lorsqu'un stimulus atteint une intensité suffisante pour générer un potentiel d'action, celui-ci sera acheminé le long des afférences primaires vers la corne dorsale de la moelle épinière (*A Basic Review of Pain Pathways and Analgesia*, 2019; Yam et al., 2018). Par la suite, les signaux nociceptifs seront transmis aux centres supérieurs par le système nerveux central, puis interprétés par celui-ci, causant la douleur. En ce sens, la nociception peut se produire en absence de douleur, mais aucune douleur n'est possible sans nociception. Il existe deux types de nocicepteurs. Le premier inclut les fibres afférentes myélinisées de moyen diamètre ( $A\delta$ ) qui médient la douleur localisée, aiguë et rapide. Les nocicepteurs  $A\delta$  sont sous-divisés en type I et type II. Les nocicepteurs  $A\delta$  de type I répondent préférentiellement aux stimuli nociceptifs mécaniques et chimiques, alors que les fibres  $A\delta$  de type II répondent préférentiellement aux stimuli nociceptifs thermiques, au détriment des stimuli nociceptifs mécaniques (Dubin & Patapoutian, 2010). Le deuxième type de nocicepteurs est formé des fibres nociceptives C. Ce sont des petites fibres non myélinisées à conduction lente. Même si la majorité des fibres C nociceptives sont polymodales, et répondent donc à des stimuli chimiques, thermiques et mécaniques, il existe certaines sous-populations sélectives aux stimuli chimiques ou mécaniques (Basbaum et al., 2009; Dubin & Patapoutian, 2010). L'activation de ces nocicepteurs

entraîne la relâche, par les terminaisons centrales des afférences primaires, des neurotransmetteurs excitateurs CGRP, glutamate et substance P. Ces neurotransmetteurs vont ensuite activer les neurones de deuxième ordre (principalement) situés dans la corne dorsale de la moelle épinière, ou dans le noyau *caudalis* (Ossipov, 2012). L'information nociceptive sera alors relayée le long de ces neurones de second ordre, également appelés neurones de projection, jusqu'au cerveau, au niveau du thalamus. L'information se rendra ensuite jusqu'au cortex somatosensoriel à travers les voies spinothalamiques. Ensuite, l'information nociceptive sera transmise par des neurones de troisième ordre vers différentes zones du cerveau, dépendamment de la location et du type de stimulus douloureux. L'ensemble de processus de communication partant du stimulus douloureux jusqu'au cerveau se nomme la voie ascendante. Lorsque les signaux nociceptifs ont été intégrés par les différentes zones du cerveau, il s'ensuit un retour de signal permettant la modulation des signaux nociceptifs ascendants. Ces systèmes de modulation de la douleur sont appelés systèmes inhibiteurs descendants de la douleur. La modulation de la douleur implique l'acide aminobutyric- $\gamma$ , un neurotransmetteur inhibiteur. Les terminaisons nerveuses de la voie descendante inhibitrice ont pour origine la médulla rostroventrale et d'autres noyaux du tronc cérébral, ainsi que du noyau du tractus solitaire, le noyau parabrachial, le noyau dorsal réticulaire, l'hypothalamus et le cortex (Dinakar & Stillman, 2016). Ces neurones interagissent avec les fibres afférentes, les interneurones et les neurones de projections de la corne dorsale de la moelle épinière. L'action de ces neurones à ces sites va ensuite soit augmenter, soit diminuer le passage de l'information nociceptive vers les structures impliquées dans le traitement secondaire de la douleur, par exemple la substance grise périaqueducale et l'amygdale.

#### 1.1.4 Traitement de la douleur

La douleur peut se traiter de différentes façons. Le choix de traitement dépend de plusieurs facteurs, et peut varier en fonction des pratiques cliniques d'un centre à l'autre. La grande hétérogénéité, ainsi que le nombre élevé des différentes conditions de douleur freinent l'apparition d'un algorithme de traitement général. Les conditions de comorbidités qui accompagnent souvent la douleur, telles la dépression et l'anxiété, ne seront pas détaillées dans le cadre de ce mémoire. Il existe deux grands types de traitements pour la douleur; soit les traitements pharmacologiques et ceux non pharmacologiques.

L'*American Pain Society* recommande l'utilisation conjointe de traitements pharmacologiques et non pharmacologiques pour le traitement de la douleur aiguë et cancéreuse (Gordon et al., 2005). Les traitements non pharmacologiques comprennent, mais ne se limitent pas, à la méditation, le yoga, l'acuponcture et les traitements chiropratiques. Ces traitements pourraient supporter et augmenter la notion de « prendre soin de soi » et sont souvent préconisés dans l'optique d'une meilleure santé globale, et bien souvent comme traitements préventifs (Chen & Michalsen, 2017). Bien que souvent recommandée par les cliniciens, la qualité des preuves soutenant l'efficacité de ces traitements sur la douleur est faible et bien souvent controversée. La deuxième branche formant les traitements non pharmacologiques inclut les chirurgies. La chirurgie est habituellement indiquée lorsque la cause sous-jacente est bien définie et qu'il y a un bénéfice clinique net à retirer. Bien que généralement très efficaces, les opérations chirurgicales permettant de traiter la douleur sont rares (Cruccu et al., 2016).

Les traitements pharmacologiques sont, à ce jour, les traitements les plus efficaces et les plus couramment utilisés pour réduire la douleur dans un grand éventail de conditions douloureuses. Les traitements pharmacologiques pour traiter la douleur sont appelés analgésiques. Il existe plusieurs classes d'analgésiques, souvent distingués en analgésiques opioïdiques (discutés dans la section suivante) et non opioïdiques. Les analgésiques non opioïdiques ont été majoritairement développés en réponse à des conditions autres que la douleur, et ont des effets biologiques variés. Parmi les analgésiques non opioïdiques sont retrouvés les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les antidépresseurs et les antiépileptiques. Les analgésiques non opioïdiques possèdent plusieurs sites d'action différents, incluant la potentialisation des voies descendantes inhibitrices de la douleur, le blocage des récepteurs pré et postsynaptiques de la corne dorsale de la moelle épinière, ainsi que l'inhibition de la relâche de neurotransmetteurs inhibiteurs (Finnerup, 2019). La deuxième classe majeure d'analgésiques pharmacologiques est formée par les composés opioïdes.

## 1.2 Les opioïdes

Les opioïdes forment un groupe d'analgésiques couramment utilisé dans la pratique clinique. Bien que toujours pertinent dans la médecine moderne, les opioïdes sont utilisés depuis des milliers d'années. Certaines preuves suggèrent que le pavot à

opium *Papaver somniferum* était déjà cultivé pour ses principes actifs en 3000 av. J.-C. Cependant, ce n'est que lorsque la morphine fut isolée de l'opium, en 1806, que la pharmacologie moderne des opioïdes est vraiment née. Bien qu'étant l'alcaloïde extrait de *P. somniferum* le plus connu, la morphine, n'est pas le seul alcaloïde pouvant en être isolé. En effet, la codéine, la papavérine et la thébaine peuvent toutes être extraites de la même plante. Suivant la découverte de la morphine, de simples manipulations chimiques des différents alcaloïdes ont menées à la synthèse de plusieurs opioïdes utiles dans la médecine actuelle, telle la buprénorphine, la diamorphine et la naloxone. Les opioïdes peuvent être classés en fonction de leur processus de synthèse dans l'un des trois groupes suivants : les composés naturels, les composés semi-synthétiques, et les composés synthétiques. Une autre façon de classer les opioïdes et de les classer en fonction de leurs effets sur les récepteurs aux opioïdes. Avec cette classification, les opioïdes peuvent alors être classés comme agonistes, agonistes partiels, agonistes inverses et antagonistes. Un agoniste interagira avec son récepteur afin de produire un effet potentiellement maximal, alors qu'un antagoniste se liera au récepteur, mais n'entraînera aucun effet, empêchant ce récepteur d'être activé par un agoniste. Un agoniste partiel se liera à son récepteur, mais ne pourra pas causer l'effet maximal du récepteur, et ce, peu importe la dose administrée (Blakemore & White, 2002). Malgré le profil analgésique très intéressant de plusieurs opioïdes et leur utilisation au quotidien en clinique, ces composés sont la cause d'un problème sociétal contemporain très important : la crise des opioïdes. Cette crise se traduit comme une augmentation rapide et importante du nombre de décès et des coûts sur le système de la santé liés à l'utilisation d'opioïdes. La mauvaise utilisation des opioïdes de prescription et l'augmentation de la disponibilité des drogues de synthèse opioïdes comme l'héroïne et le fentanyl sur le marché forment deux des piliers les plus importants sur lesquels repose cette crise (Fischer et al., 2020; Skolnick, 2018).

### 1.2.1 Les récepteurs aux opioïdes

Les récepteurs aux opioïdes sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) de classe A « rhodopsin-like ». Il existe 4 récepteurs aux opioïdes. Pour qu'un récepteur soit reconnu comme un récepteur aux opioïdes, il doit pouvoir être lié par la naloxone, un antagoniste non sélectif de ces récepteurs. Classiquement, les trois principaux récepteurs

auxopioïdes sont les récepteurs delta ( $\delta$ , DOP), mu ( $\mu$ , MOP) et kappa ( $\kappa$ , KOP). Les noms de ces récepteurs ont pour origine la morphine (le ligand exogène du MOP le plus connu), « vas deferens » (le nom du tissu duquel le DOP a été originalement isolé) et la kytocyclazocine (le premier ligand découvert agissant sur le KOP). Ces trois récepteurs possèdent des ligands endogènes, soit l'endorphine, l'enképhaline et la dynorphine pour les récepteurs mu, delta et kappa, respectivement. Les récepteurs aux opioïdes appartiennent tous à la grande famille des RCPG. Ils sont tous couplés aux protéines G, plus spécifiquement les protéines G inhibitrices (Gai/o) (Standifer & Pasternak, 1997). Cette signalisation mènera éventuellement à la fermeture des canaux calciques voltage dépendant, une augmentation de l'efflux potassique et l'inhibition de l'AC, diminuant la production d'AMPc. Ultimement, ces effets causeront l'hyperpolarisation de la membrane, diminuant la propagation de l'information nociceptive. La signalisation sera ensuite inactivée par l'hydrolyse du GTP, qui est facilitée par la liaison de protéines régulatrices de signalisation des protéines G. De façon concomitante, l'activation des récepteurs opioïdes va également mener à leur désensibilisation lorsque ceux-ci seront phosphorylés par des kinases comme les kinases à RCPG et la protéine kinase C. Les arrestines seront ensuite recrutées par les récepteurs phosphorylés, menant d'une part à une signalisation subséquente par les arrestines, et d'une autre part à l'internalisation, la régulation négative et le recyclage du récepteur en question (Lamberts & Traynor, 2013). Le quatrième récepteur aux opioïdes est le récepteur à la nociceptine (NOP). Le récepteur à la nociceptine est considéré comme un récepteur opioïde dû à sa grande similarité aux autres récepteurs opioïdes en termes d'acides aminés, et possède lui aussi un ligand endogène. Par contre, puisque la naloxone ne renverse pas les effets de l'activation de celui-ci, le NOP est généralement considéré comme un récepteur faisant parti de la branche non-opioïdergiques, de la famille des opioïdes (Pathan & Williams, 2012). De plus, bien que de plus en plus d'études s'intéressent aux rôles du NOP, notamment à ses interactions avec les autres récepteurs opioïdes (Mustazza\* & Marzoli, 2018), il reste une cible très peu connue.

### 1.2.2 Les récepteurs couplés aux protéines G

Les RCPG forment la plus grande famille de récepteurs connus à ce jour. Ce sont également les récepteurs qui médient le plus grand nombre de réponses cellulaires dû aux



hormones et neurotransmetteurs, en plus d'être responsables de la vision, de l'odorat et du goût. Les RCPGs sont caractérisés par leurs 7 domaines transmembranaires en hélices- $\alpha$ , séparés en alternance par des boucles intra- et extracellulaires. Chez les vertébrés, les RCPGs sont habituellement divisés en 5 sous-familles sur la base de leur séquence et similarité structurale (Fredriksson et al., 2003). Ces 5 familles sont la famille des rhodopsines (famille A), de la sécrétine (Famille B), du glutamate (famille C), la famille des récepteurs d'adhésion et finalement celle des récepteurs de type « frizzled » de goût. Parmi ces sous-familles, la famille des rhodopsines est de loin la plus grosse et plus diversifiée. L'autre grande caractéristique de cette famille de récepteurs est qu'ils sont couplés aux protéines G. Les protéines G qui s'associent aux RCPGs ont tous trois sous-unités (sous-unité  $\alpha$ , sous-unité  $\beta$ , sous-unité  $\gamma$ ), ce qui fait d'eux des hétérotrimères. Les sous-unités alpha et gamma sont ancrées à la membrane plasmique par des lipides. Les protéines G sont des protéines spécialisées avec la capacité de lier la guanosine triphosphate (GTP) et la guanosine diphosphate (GDP), modulant ainsi leur activation (*GPCR | Learn Science at Scitable*, s. d.). Lorsqu'une protéine G est activée, la sous-unité alpha, liée au GTP, ainsi que le complexe formé des sous-unités bêta gamma peuvent relayer les signaux extracellulaires en interagissant avec d'autres protéines membranaires impliquées dans la transduction de signal. Il existe quatre familles de sous-unités alpha différentes, soit  $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha i/o}$ ,  $G_{\alpha q/11}$  et  $G_{\alpha 12/13}$  (Wettschureck & Offermanns, 2005), qui médient chacune différentes transductions de signaux. Chacune de ces familles inclut plusieurs sous-types de sous-unités alpha, avec la famille  $G_{\alpha i/o}$  étant la plus grande et celle qui comprend le plus grand nombre de sous-unités distinctes. Étant si importantes dans un si grand nombre de fonctions, les RCPGs ainsi que leur signalisation ont fait le sujet d'une pléthore d'études. Chacune des familles des protéines G possède différents effecteurs de transduction de signal. Les familles  $G_{\alpha s}$  et  $G_{\alpha i/o}$  régulent toutes les deux les niveaux d'adénylate cyclase. Les  $G_{\alpha s}$  vont stimuler la conversation par l'adénylate cyclase de l'ATP en AMP cyclique (Wettschureck & Offermanns, 2005). Des niveaux élevés d'AMPc vont mener à l'activation de plusieurs autres protéines régulées par celle-ci, par exemple la protéine kinase A, certains facteurs d'échange de guanidine comme EPAC et des nucléotides cycliques. Les  $G_{\alpha i/o}$ , de façon contraire, vont inhiber certains isotopes d'adénylates cyclases, menant à une diminution d'AMPc. Les  $G_{\alpha q/11}$  activent l'isoforme

bêta de la phospholipase C, augmentant le clivage du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate en inositol triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG) ancré à la membrane. L'IP3 ira ensuite se lier sur son récepteur à la surface du réticulum endoplasmique, alors que le DAG ainsi formé activera la protéine kinase C. Finalement, la famille des protéines Gα12/13 interagissent avec un très grand nombre de protéines impliquées dans la transduction de signal, notamment avec certaines RhoGEFs et kinases à tyrosines (Syrovatkina et al., 2016).

### 1.2.3 Le récepteur opioïde mu

Le MOP, à l'instar de tous les récepteurs aux opioïdes, fait partie de la grande famille des RCPGs, tel que confirmé par cristallographie (Manglik et al., 2012). À l'échelle de la séquence en acides aminés, MOP présente 60 à 70% d'homologie avec les autres récepteurs aux opioïdes. MOP fait partie des RCPGs couplés aux protéines Gαi/o, et son activation mène donc à l'hyperpolarisation de la cellule, reflétant son action principale analgésique. Le MOP est le récepteur opioïde le plus ciblé par les agonistes cliniques. Certaines molécules très connues tels la morphine, l'hydromorphone, le fentanyl et la codéine ciblent ce récepteur et produisent la majorité de leurs effets via leur interaction avec le récepteur mu. Malgré l'emploi clinique considérable des agonistes ciblant le MOP, leur utilisation est également associée à un grand nombre d'effets secondaires telle la dépression respiratoire, la tolérance, de l'hyperalgésie, la constipation, des nausées et la dépendance (Ding et al., 2018; Gendron et al., 2015). Le potentiel de dépendance de ces molécules, combiné aux effets hallucinogènes et euphoriques qu'elles procurent, font des agonistes du MOP des choix populaires comme drogues de rue, contribuant ainsi au développement de la crise des opioïdes actuelle. En effet, à la vue des effets secondaires relativement grave de l'activation de ce récepteur, par exemple la dépression respiratoire, la prise non régulée de certains agonistes puissants du MOP comme le fentanyl peut rapidement être fatal. Heureusement, il est possible de renverser les effets d'une surdose d'opioïdes par l'administration intraveineuse de naloxone. La naloxone est un antagoniste compétitif non sélectif des récepteurs aux opioïdes, avec généralement très peu d'effet à moins qu'il y ait des opioïdes dans la personne. Lorsqu'administré rapidement chez une personne en surdose d'opioïdes, celui-ci peut compétitionner avec les molécules opioïdiques liées aux récepteurs et ainsi

diminuer les symptômes associés à la surdose, et potentiellement sauver des vies (Wermeling, 2015). Bien que la naloxone permette de traiter les surdoses d'opioïdes, il est impératif de continuer la recherche sur ce récepteur ainsi que d'autres cibles afin de minimiser les effets secondaires et développer de nouveaux traitements plus sécuritaires, ou encore d'autres cibles alternatives.

#### 1.2.4 Le récepteur opioïde delta

Le DOP est une cible clinique très peu exploitée en clinique à l'heure actuelle. Il est distribué dans presque l'entièreté du système nerveux central, plus spécifiquement dans la substance grise périaqueducale, la médulla rostroventrale, l'amygdale et le cortex cérébral (Cahill, McClellan, et al., 2001; Mennicken et al., 2003; Scherrer et al., 2009; H.-B. Wang et al., 2010). Le DOP possède une bonne efficacité analgésique dans certaines conditions telle la douleur chronique (Gavériaux-Ruff & Kieffer, 2011; Kieffer & Gavériaux-Ruff, 2002) et dans certains troubles émotionnels et neurologiques (A. A. Pradhan et al., 2010). En plus de son profil analgésique prometteur, l'utilisation du DOP comme cible thérapeutique présente d'autres avantages tels des effets anxiolytiques et antidépresseurs. L'utilisation du DOP comme cible thérapeutique présente également l'avantage d'un profil d'effets secondaires moins sévère que ceux du MOP et KOP, principalement au niveau de la dépression respiratoire, l'effet secondaire le plus responsable des décès liés à l'utilisation de cette classe d'analgésique. L'activation du DOP a également été montré comme ayant moins d'effets euphoriques que le MOP, limitant donc le potentiel réactionnel des agonistes sélectifs de ce récepteur (Charbogne et al., 2014). En dépit des avantages des agonistes du DOP, ceux-ci peuvent mener à une tolérance non négligeable (A. A. A. Pradhan et al., 2010), ainsi qu'à des convulsions dues à l'excitabilité accrue de certaines régions du cerveau antérieur (Chu Sin Chung & Kieffer, 2013).

### 1.3 Signalisation des récepteurs opioïdes

#### 1.3.1 Activation des protéines G effectrices

Les récepteurs aux opioïdes sont principalement couplés aux protéines hétérotrimériques sensibles à la toxine pertussis  $G_i/G_o$ , bien que certaines études aient rapporté un couplage aux protéines  $G_s/G_z$ , insensibles à la toxine pertussis (Crain & Shen, 1990; Garzón et al., 1998; Yang et al., 2000). Il a longtemps été suggéré que l'activation des RCPGs par la liaison d'un agoniste impliquait des changements au niveau

transmembranaire, entraînant une exposition des boucles intracellulaires, les rendant plus facilement accessibles aux protéines G. Plusieurs études ont étudié le rôle de la deuxième et troisième boucle intracellulaire des RCPGs (dont DOP et MOP), établissant qu'elles étaient primordiales, avec la queue C-terminale, pour le couplage des RCPGs aux protéines G (Gether, 2000). Lors de l'activation des récepteurs, les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta\gamma$  interagissent tous deux avec une multitude de systèmes de protéines effectrices intracellulaires, tels que des canaux ioniques (ex : Cav1.2 et Kir3), des enzymes membranaires (ex : AC, phospholipases) ainsi que certaines cascades de kinases (ex : celles appartenant à la famille MAPK).

### 1.3.2 Adénylatecyclase

L'adénylate cyclase est l'enzyme qui synthétise l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) à partir d'adénosine triphosphate (ATP). L'AMPc agit souvent en tant que messenger second intracellulaire important dans le relai de la transmission des signaux extracellulaires aux effecteurs de signal intracellulaire, particulièrement la protéine kinase A. En effet, la régulation de la PKA est en grande partie sujette aux concentrations intracellulaires d'AMPc (Mons et al., 1998). L'AC est une protéine membranaire consistant en deux amalgames de 6 segments transmembranaires, ainsi que deux domaines catalytiques se prolongeant sous forme de boucles dans le cytoplasme. L'activation de l'AC entraîne donc l'augmentation des niveaux intracellulaires d'AMPc (Cooper et al., 1995).

Il existe au moins 9 isoformes de l'AC. Ces isoformes diffèrent considérablement dans leurs propriétés de régulation et sont exprimées différemment dans les différents tissus, supportant que cette enzyme fasse partie d'un système complexe d'interactions permettant la régulation de la production d'AMPc. Les premières études s'intéressant à l'activité de l'AC ont conclu que cette enzyme était régulée principalement par ses interactions avec les sous-unités  $\alpha$  des protéines  $G_s/G_i$ , augmentant ou diminuant son activité, respectivement. De récentes études sur l'AC ont mené à la conclusion que les mécanismes de régulation de l'AC étaient plus complexes qu'initialement soupçonnés, et qu'en plus des sous-unités  $\alpha$  des protéines  $G_s/G_i$ , les dimères  $\beta\gamma$  de ces protéines G, ainsi que la protéine kinase C jouaient

tous un rôle essentiel dans la régulation de l'AC (Bruce et al., 2019; Halls & Cooper, 2017). L'activation des récepteurs MOP et DOP et l'inhibition subséquente de la voie de signalisation de l'AC ont principalement été liées aux effets et adaptations physiologiques à long terme de l'administration répétée de composés opioïdes (Nestler, 2004; Nestler & Aghajanian, 1997). Ainsi, il a été montré que la régulation à la hausse de l'adénylate cyclase et d'autres composants de la voie de l'AMPc, dans certaines régions spécifiques du système nerveux central et périphérique, contribuait à la tolérance, la dépendance et aux modifications des mécanismes de récompense suite à l'administration répétée d'opioïdes.

### 1.3.3 La phospholipase C

La phospholipase C est une protéine soluble principalement localisée dans le cytosol qui transfère à la membrane plasmique en réponse à l'activation cellulaire. Treize isoformes de la PLC ont été identifiées à ce jour, et sont catégorisées en six familles différentes, en fonction de leur structure et leurs mécanismes d'activation et de régulation (Fukami et al., 2010). La distribution des différentes isoformes de la PLC reflète en grande partie leurs fonctions physiologiques. L'activation de la PLC produit au moins deux seconds messagers, soit l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) et le diacylglycerol (DAG). L'effet principal du DAG est d'activer la protéine kinase C (PKC), alors que l'effet de la production d'IP3 est la relâche de  $\text{Ca}^{2+}$  des réserves intracellulaires. Un débalancement dans les niveaux d'expression de la PLC, ou un dérèglement dans le réseau de signalisation de cette enzyme mène souvent à la pathogenèse de maladies, chez l'Homme (Berman et al., 2008; Fu et al., 2007; Wells & Grandis, 2003). Les récepteurs opioïdes activent la phospholipase C par le biais de protéines G sensibles à la toxine pertussis (Murthy & Makhoul, 1996). En effet, les opioïdes stimulent la formation d'IP3, et donc mobilisent les ions calciques des réserves intracellulaires dans les cellules NG108-15 (Smart & Lambert, 1996). Il a été préalablement montré que la suppression de l'activité de la PLC abolissait l'inhibition de l'adénylate cyclase par les récepteurs opioïdes et certains autres récepteurs couplés aux protéines  $G_i/G_o$  (Pan et al., 2008). Le rôle particulièrement important de la PLC dans la transduction de signaux pour les récepteurs aux opioïdes est souligné par la prévention de l'activation des récepteurs aux opioïdes lors de l'inhibition de la PLC (Wu et al., 1998).

### 1.3.4 Les canaux ioniques

#### 1.3.4.1 Les canaux potassiques à rectification entrante de la famille Kir3

Les canaux Kir3 contrôlent l'excitabilité cellulaire dans le système nerveux central et au niveau du cœur. Dû à leur distribution ubiquitaire, ils régulent les effets d'une large gamme d'hormones et de neurotransmetteurs qui, lors de l'activation des RCPGs correspondants, conduisent à l'ouverture de ces canaux. Les canaux Kir3 sont des tétramères formés par l'association de quatre sous-unités différentes (Kir3.1-3.4) (Gao et al., 2007). La combinaison des sous-unités formant les canaux dépend de la population neuronale impliquée (Cruz et al., 2004), ainsi que le compartiment cellulaire (Fernández-Alacid et al., 2009) dans lesquels ils sont retrouvés. Ces canaux ioniques sont activés par une cascade de signalisation lors de l'activation de certains RCPGs par un ligand. Cette activation se fait par le complexe protéique formé par les sous-unités  $\beta\gamma$  des protéines G se liant aux extrémités N et C terminales du canal ce qui entraîne son ouverture et l'entrée de  $K^+$  induisant l'hyperpolarisation de la membrane cellulaire. Les canaux potassiques de la famille Kir3 jouent donc un rôle clé dans la maintenance du potentiel membranaire de repos et dans la régulation de la durée du potentiel d'action dans des cellules excitables.

#### 1.3.4.2 Les canaux calciques voltage-dépendants

Les canaux calciques voltage-dépendants sont des transducteurs clés des changements de potentiels transitoires de membrane par la modulation des afflux de  $Ca^{2+}$  intracellulaires. Chez les mammifères, il existe dix membres faisant partie de la famille des canaux calciques voltage-dépendants, séparés dans 3 sous-familles, servant chacun des rôles distincts dans la transduction de signal intracellulaire (Catterall, 2011). La plupart des canaux ioniques, chez les mammifères, sont activés par les RCPGs et les hormones. Lors de la dissociation du complexe  $G\alpha$ -GTP et  $G\beta\gamma$  suite à l'activation d'un RCPG par un ligand, ceux-ci peuvent aller activer ou inhiber une grande variété de protéines effectrices, et peuvent réguler les canaux ioniques de façon indirecte (via les seconds messagers et les protéines kinases) ou directement, via des interactions physiques entre les sous-unités des protéines G et les canaux ioniques. En effet, plusieurs études antérieures ont montré que le complexe protéique  $G\beta\gamma$  interagit directement avec les canaux calciques voltage-dépendants afin d'inhiber leur activité (Dascal, 1997; Dolphin, 1998; Jan & Jan, 1997; Wickman & Clapham, 1995). À l'instar des canaux potassiques, l'inhibition des canaux calciques entraînera une hyperpolarisation de la membrane, diminuant la transmission des

signaux nociceptifs par l'inhibition de la propagation des signaux d'une cellule à l'autre.

### 1.3.5 Les protéines kinases activées par des mitogènes

Les protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK) sont une famille de sérine/thréonine kinases activée face à une pléthore de stimuli extracellulaires tels des facteurs de croissance, des mitogènes et des cytokines pro-inflammatoires (Julius & Basbaum, 2001). Par contre, les mécanismes cellulaires d'activation de la cascade de signalisation de MAPK sont connus comme étant très différents en fonction du type de RCPG activé et du système cellulaire (Goldsmith & Dhanasekaran, 2007). Elles régulent plusieurs activités cellulaires telles que la croissance, la mitose, la prolifération et la survie cellulaire. Les récepteurs aux opioïdes vont activer la cascade ERK1/2 en réponse à la plupart des stress mentionnés ci-haut. Lors du recrutement des kinases Src par les arrestines, celles-ci seront activées par les complexes protéines  $G_{i\alpha}$  et  $G_{\beta\gamma}$ , entraînant la phosphorylation des récepteurs au EGF (Schulz et al., 2004).

### 1.3.6 Activité constitutive

Plusieurs RCPGs exhibent un certain niveau de signalisation constitutive à l'état basal, impliquant donc l'activation potentielle des protéines G en absence d'agonistes (Gether, 2000). Le DOP possède un certain niveau d'activité constitutive lorsqu'ils sont exprimés de manière endogène dans les neuroblastomes, ou de manière hétérologue dans diverses lignées cellulaires (Costa & Herz, 1989). De plus, certains agonistes inverses du DOP régulent à la hausse l'expression de DOP à la surface cellulaire, indépendamment de l'activation des protéines G (Gendron et al., 2016; Hosohata et al., 1999; Neilan et al., 1999; Zaki et al., s. d.). Plusieurs études ont également montré que le MOP possède lui aussi un certain niveau d'activité de signalisation constitutive, notamment dans les cellules SH-SY5Y et dans les HEK293 transfectées (Z. Wang et al., 1994). De surcroît, l'activité constitutive de MOP est plus élevée après une exposition chronique à la morphine (Z. Wang et al., 1994). Ce phénomène a été suggéré comme contribuant au développement de la tolérance et de la dépendance lors de la prise d'agonistes du MOP. Le mécanisme moléculaire sous-jacent à l'augmentation de l'activité constitutive du MOP à la suite de l'administration chronique de morphine pourrait impliquer la calmoduline. Dans l'état inactif du MOP (non-lié par un ligand), la calmoduline se lie au MOP au niveau de sa troisième boucle intracellulaire et entre en compétition avec les protéines G, inhibant ainsi

leur couplage et l'activité constitutive du récepteur. Suite à un traitement prolongé à la morphine, la calmoduline est libérée du récepteur, ce qui entraîne une augmentation de l'activité du récepteur, indépendamment de la présence d'un ligand (D. Wang et al., 2001).

### 1.3.7 Trafic intracellulaire

Le trafic intracellulaire des récepteurs mu et delta diffère considérablement l'un de l'autre. Le MOP est recyclé à la surface cellulaire à la suite d'un traitement avec un agoniste, alors que le DOP est en grande partie redirigé vers les lysosomes, où il sera dégradé. Bien que la queue C-terminale du MOP et du DOP ait initialement été soupçonnée comme déterminant principal de cette différence de trafic intracellulaire, la synthèse de récepteurs chimères du DOP et du MOP dans lesquels les queues C-terminales ont été échangées a montré que le trafic différentiel des deux récepteurs n'était pas uniquement dû aux domaines des queues C-terminales. En effet, des expériences dans lesquelles certains motifs dileucines présents dans la troisième boucle intracellulaire du DOP étaient mutés ont montré qu'ils étaient également importants pour le trafic intracellulaire vers les voies de dégradation lysosomales (W. Wang et al., 2003). En plus de la différence de trafic intracellulaire suite à l'activation des récepteurs par un agoniste, il existe également des différences dans les localisations intracellulaires du MOP et du DOP. Alors que le MOP est principalement localisé à la membrane plasmique à l'état basal, le DOP est quant à lui localisé majoritairement au niveau du réticulum endoplasmique (Petäjä-Repo et al., 2001; Zastrow et al., 2003). Il existe cependant plusieurs conditions dans lesquels le transport du DOP à la membrane est augmenté, notamment suite à un traitement prolongé à la morphine (Cahill, Morinville, et al., 2001; Gendron et al., 2006; Lucido et al., 2005; A. A. A. Pradhan et al., 2010) et lors d'une inflammation chronique (Morinville et al., 2003).

### 1.3.8 Biais de signalisation

Les premiers modèles de l'activité fonctionnelle des RCPGs assumaient que ces récepteurs n'avaient que deux états d'activation : actif et inactif. Classiquement, on croyait que la liaison de l'agoniste au récepteur favorisait la transition (par modification/stabilisation de la structure des protéines) du récepteur d'un état inactif à un état actif capable de recruter et engager les protéines G et ainsi moduler les différentes



voies de signalisation de ce récepteur. Cependant, la recherche de la dernière décennie nous ont permis de réaliser que la fonctionnalité des RCPGs dépend de nombreuses autres protéines en dehors du noyau heptahélique, par exemple du site d'expression du RCPG en question dans un tissu donné et, surtout, des états actifs des RCPGs en fonction du couplage préférentiel envers certaines protéines de transduction de signal spécifique en fonction de la conformation active adoptée par le récepteur (Samama et al., 1994). Les résultats de ces études ont confirmé l'hypothèse que les récepteurs adoptent typiquement un équilibre spontané entre deux conformations (active, inactive) qui diffèrent dans leur capacité à activer les protéines G en aval. Dans ce nouveau modèle, à l'état natif, le récepteur est maintenu principalement dans sa conformation inactive par des interactions intramoléculaires dans ses domaines transmembranaires; c'est-à-dire que l'équilibre spontané favorise fortement l'état inactif (Donnelly et al., 1999). Lors de la liaison au récepteur par un agoniste, il y aura une diminution de ces contraintes intramoléculaires, permettant au récepteur de se « détendre » vers sa conformation active, facilitant le couplage des protéines G. Ce nouveau modèle d'activation des RCPGs aide à expliquer l'efficacité différentiel des agonistes; elle sera dictée de façon intrinsèque par sa capacité à modifier l'équilibre entre la forme inactive du récepteur et sa forme active.

### 1.3.9 Oligomérisation des récepteurs opioïdes

Les preuves de l'interaction des RCPGs entre eux ont d'abord été mises de l'avant par des études hydrodynamiques et des expériences de réticulation de plusieurs RCPGs (Bouvier, 2001; Devi & Brady, 2000; Jordan & Devi, 1999). Cependant, les conséquences de l'interaction et de l'oligomérisation des RCPGs sont encore nébuleuses et font toujours le sujet de plusieurs études. La capacité des récepteurs aux opioïdes à oligomériser a été montrée par des expériences d'immunoprécipitation, puis des essais de BRET (Jordan & Devi, 1999; D. Wang et al., 2005). L'oligomérisation des récepteurs opioïdes entre eux peut affecter leurs propriétés fonctionnelles, notamment en modulant la puissance et l'affinité de certains ligands opioïdiques (George et al., 2000; Ivone Gomes et al., 2004; Jordan & Devi, 1999).

## 1.4 Projet : Identification de partenaires protéiques potentiels des récepteurs opioïdes mu et delta par APEX2

Les RCPGs sont exprimés à la surface cellulaire où ils sont couplés aux protéines G hétérotrimériques inactives et probablement plusieurs autres protéines connues et

inconnues. Comme mentionné plus haut, l'activation des récepteurs opioïdes delta et mu peut entraîner l'apparition d'effets secondaires indésirables, limitant leur utilisation. Une meilleure compréhension des mécanismes et partenaires d'interaction impliqués dans la signalisation des récepteurs opioïdes pourrait permettre de minimiser ces effets. Dans ce projet, je me concentrerai sur l'identification des partenaires protéiques adjacents et interagissant avec MOP et DOP dans leur état inactif ainsi qu'une fois activés par des agonistes opioïdes.

#### 1.4.1 Outils d'identification de partenaires protéiques

Les protéines sont les acteurs principaux facilitant la plupart des processus biologiques dans une cellule. Étant donné la complexité et la diversité des fonctions cellulaires nécessaires au maintien de l'intégrité d'un organisme, il n'est pas surprenant qu'il est estimé qu'il existe chez l'Humain plus de 100 000 protéines différentes, codées à partir de 20300 gènes uniques (Ponomarenko et al., 2016). Ce très grand nombre de protéines différentes, interagissant toutes de façon dynamique avec certaines autres protéines, soulève un problème important lors de l'analyse de l'interactome protéique : comment identifier les partenaires protéiques d'une interaction donnée? Pour répondre à cette question, plusieurs outils ont été développés dans les dernières décennies nous permettant de mieux comprendre et interroger les modes d'action de ces molécules essentielles au maintien de la vie.

#### 1.4.2 Co-immunoprécipitation

La co-immunoprécipitation (Co-IP) est une méthode très populaire d'analyse d'interaction entre protéines. Dans cette méthode, la protéine cible précipitée par l'anticorps, également appelée « appât », est utilisée pour co-précipiter un complexe partenaire de liaison/protéine, à partir d'un lysat. La protéine d'interaction est alors liée à l'antigène cible, qui est lié par l'anticorps qui est lui-même immobilisé sur un support (habituellement des billes). Les partenaires protéiques ainsi précipités vont souvent être détectés par électrophorèse sur gel de dodécyl sulfate de sodium - polyacrylamide, puis transférés sur une membrane de nitrocellulose avant d'être visualisés par immunobuvardage. Cette technique peut être utilisée afin d'identifier des partenaires d'interactions stables et/ou fortes (Iqbal et al., 2018). La co-immunoprécipitation est très utilisée en laboratoire dû à sa facilité d'utilisation, mais présente le désavantage de

nécessiter des anticorps spécifiques, en plus de rendre très difficile la caractérisation de la composante temporelle des interactions détectées. De plus, les étiquettes utilisées (par exemple FLAG) afin de pouvoir précipiter les protéines d'intérêts peuvent entraver l'interaction de certaines protéines.

### 1.4.3 Pull-down

Cette technique est similaire en méthodologie à la co-immunoprécipitation puisqu'elle utilise également un support afin de purifier les protéines en interaction. La différence entre les deux méthodes est que la co-immunoprécipitation utilise des anticorps afin de capturer des complexes protéiques, alors que les *pull-down* utilisent une protéine « appât » pour purifier toutes les protéines d'un lysat qui se lient à celle-ci. Cette technique, à l'instar de la co-immunoprécipitation, est idéale afin d'étudier les interactions fortes ou stables, mais présente l'avantage de ne pas nécessiter la disponibilité d'un anticorps reconnaissant la protéine d'intérêt (Louche et al., 2017). Étant similaire à la méthode de co-immunoprécipitation, cette technique présente pratiquement les mêmes désavantages.

#### 1.4.1 Analyse des interactions des protéines de réticulation

La plupart des interactions protéine-protéine sont transitoires et ne se produisent que brièvement dans le cadre d'une seule cascade métabolique au sein des cellules. Cette technique consiste donc à stabiliser, ou même joindre de façon permanente les composants des complexes d'interaction. Une fois les composants fixés, plusieurs autres techniques peuvent permettre la détection, par exemple la purification par affinité et la spectrométrie de masse. Les partenaires d'interaction sont fixés à l'aide d'agents de réticulation homobifonctionnels (Mintseris & Gygi, 2020) possédant deux ou plusieurs extrémités réactives capables de se fixer chimiquement à des groupes fonctionnels spécifiques, permettant la liaison de protéines comportant ces groupes fonctionnels entre eux. Cette particularité de la technique est également sa plus grande faiblesse, puisque ce ne sont pas toutes les protéines qui présentent ces groupes fonctionnels, limitant ainsi la polyvalence de cette technique.

### 1.4.4 Transfert de protéines d'étiquettes

Les techniques actuelles d'identification de partenaires protéiques échouent bien souvent à détecter les interactions dynamiques de faibles durées ou les interactions faibles.

Pour remédier à ce problème, plusieurs techniques de transfert de protéines d'étiquettes ont été développées. Le transfert de marqueur implique de faire interagir deux protéines (une protéine proie et une protéine appât) afin de transférer un marqueur sur la proie, et identifier la proie grâce à ce marqueur. Une des grandes limites de cette technique est la cinétique d'activation des réactions typiques de transfert d'étiquette. Par exemple, BirA, une des premières enzymes utilisées dans les réactions de transfert de biotine, possédait une cinétique de réaction de l'ordre de plusieurs heures (Xu et al., 1995), limitant ainsi notre capacité à résoudre la cinétique d'interaction entre les protéines d'interaction potentielles identifiées et la protéine d'intérêt. Les avancées technologiques des dernières années ont permis d'améliorer certaines méthodes de transfert de protéines comme BioID et APEX (May et al., 2020). Ces développements ont permis de réduire les temps nécessaires pour effectuer les réactions d'étiquetage de quelques heures, par exemple dans le cas de BirA, à quelques minutes comme pour TurboID (Branon et al., 2018), et même quelques secondes dans le cas de APEX2 (Hung et al., 2016). Comme les cinétiques de réactions enzymatiques des méthodes de transfert de protéines d'étiquettes représentent bien souvent l'étape limitante de leurs utilisations, ces avancées ont permis de grandement augmenter l'efficacité et la polyvalence de cette technique afin d'identifier des partenaires protéiques potentiels. Des quelques techniques de transfert de protéines d'étiquettes qui ont été développées dans les dernières années, celle basée sur la biotinylation de proximité par APEX2 gagne en popularité.

#### 1.4.5 Biotinylation de proximité par APEX2

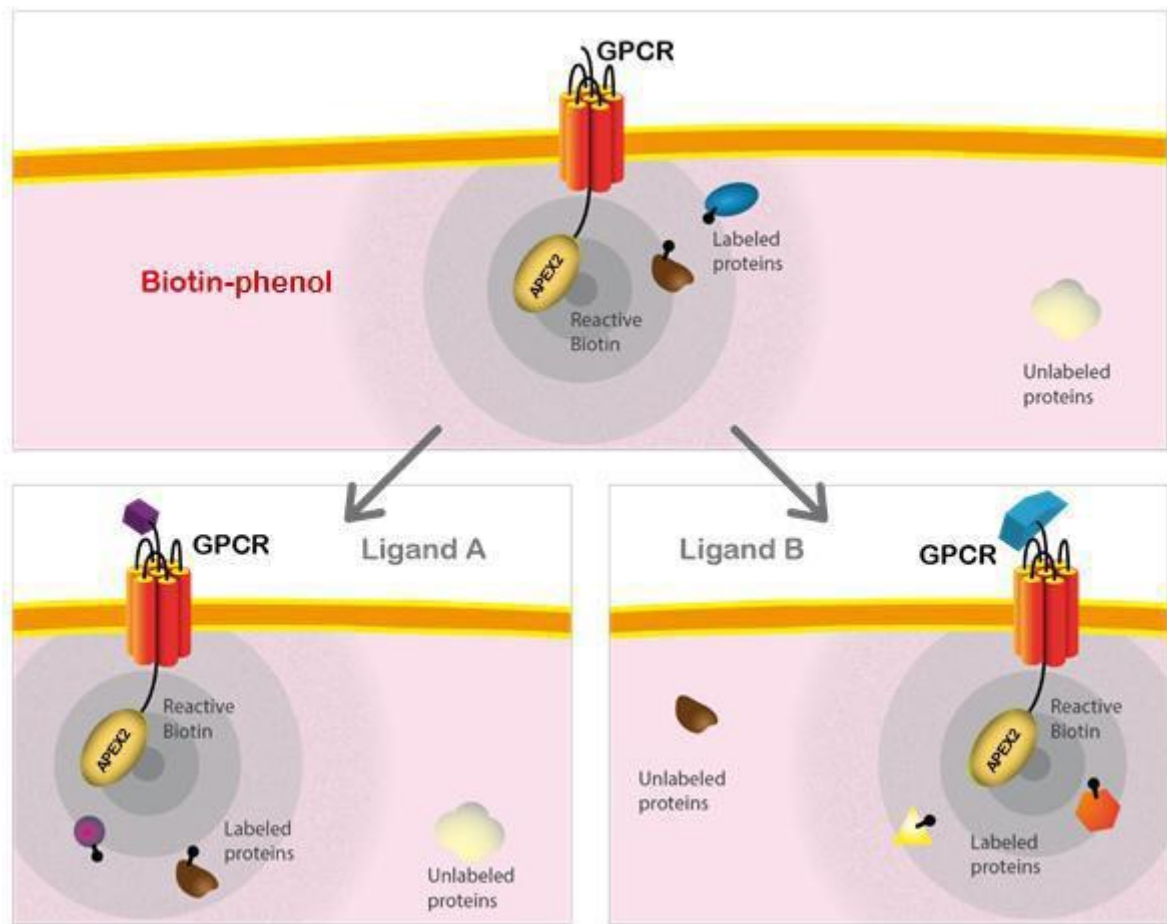
APEX2 est un mutant de la peroxydase à acide ascorbique modifiée APEX (27 kDa), issue de la fève de soya. Lorsqu'en présence de peroxyde d'hydrogène, APEX2 catalyse l'oxydation de la biotine-phénol en biotine-phénoxy, un radical éphémère (<1 ms) (Trinkle-Mulcahy, 2019) pouvant diffuser jusqu'à environ 20nm de distance. La biotine-phénoxy va ensuite réagir avec les acides aminés denses en électrons (tyrosine, tryptophane, cystéine et l'histidine) afin de se lier aux protéines proximales endogènes, permettant leur enrichissement subséquent à l'aide de billes couplées à la streptavidine et leur identification par spectrométrie de masse.

La grande polyvalence d'APEX2, en grande partie dû à sa cinétique rapide et sa grande résolution spatiale, a permis à cette technologie d'être combinée avec plusieurs

autres méthodes. Contrairement à certaines autres peroxydases, par exemple HRP, APEX2 ne possède pas de site de liaison au calcium et aux disulfures. Cette caractéristique lui permet donc d'être exprimé dans l'environnement cytosolique réducteurs des cellules, sans perte d'activité. Par conséquent, APEX2 a déjà été couplé à la microscopie électronique afin de visualiser la cartographie protéomique intracellulaire (Lam et al., 2015; Martell et al., 2017). Pour ce faire, APEX2 est fusionner de façon génétique à une protéine d'intérêt. Cette protéine de fusion est ensuite exprimée à l'intérieur des cellules. Les cellules sont ensuite fixées, puis recouvert d'une solution de diaminobenzidine (DAB) et  $H_2O_2$ . APEX2 catalyse alors la polymérisation et le dépôt local de DAB, qui recrute par la suite l'osmium dense aux électrons, prodiguant un contraste en microscopie électronique.

Tel que mentionné, le plus grand avantage d'APEX2 est qu'elle peut être combinée à la spectrométrie de masse afin d'identifier les protéines biotinylées par celle-ci. Par contre, interroger les réseaux d'interactions engagés par une protéine cible tout en capturant simultanément le contexte spatial et temporel dans lequel ces interactions se produisent. Pour permettre l'analyse des protéines biotinylées par APEX2, puis identifiées par LC-MS/MS, en diminuant le plus possible les protéines spectatrices, des méthodes comme le marquage d'isotopes stables par des acides aminés en culture cellulaire (SILAC) et des contrôles spatiaux couplés à APEX2 ont été utilisés avec succès (Hung et al., 2016; Lobingier et al., 2017).

Finalement, la capacité polyvalente d'APEX2 à catalyser l'oxydation à un électron de  $H_2O_2$  d'un large éventail de substrats a conduit à son utilisation répandue pour une variété d'autres applications, y compris la cartographie spatiale de l'ARN cellulaire (Kaewsapsak et al.), la détection de  $H_2O_2$  (Dwyer et al., 2014) et la détermination de la topologie des protéines (Lam et al., 2015; Martell et al., 2012; Rhee et al., 2013).



**Figure 1: Représentation schématique de la technologie d'étiquetage de proximité.** Les RCPGs sont liés à la peroxydase mutante APEX2 au niveau de leur queue C-terminale. En présence de  $H_2O_2$  dans le milieu de culture, APEX2 catalyse l'oxydation de la biotine phénol en biotine-phénoxy, une forme hautement réactive et éphémère de la biotine, qui réagit avec les protéines adjacentes. Le recrutement des protéines proximales est distinct et ligand-dépendant.

## 1.5 But de l'étude, objectifs et hypothèses

Le but principal de mes travaux de maîtrise était l'identification de partenaires protéiques potentiels impliqués dans la signalisation des récepteurs mu et delta à l'aide de la technique relativement récente d'identification par biotinylation de proximité APEX2. Le laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années à la caractérisation des voies de signalisation de ces récepteurs. Sébastien Grastilleur a d'abord utilisé BirA, une ligase à biotine, afin de biotinyler, puis éventuellement identifier certaines protéines interagissant avec le récepteur delta. Étienne St-Louis a pour sa part conjugué des essais d'immunoprécipitation du récepteur delta à la spectrométrie de masse dans le but similaire d'identifier certains partenaires d'interaction du récepteur delta. Plus récemment, Jade Degrandmaison a utilisé un modèle de souris *knockin* pour la protéine chimère FLAG-DOR, lui permettant d'immunoprécipiter puis envoyer en spectrométrie de masse des lysats de souris et ainsi établir le protéome de ce RCPG chez la souris (Degrandmaison et al., 2020). Lorsque combinées, ces méthodes se complètent et permettent d'obtenir une vision à la fois plus précise et plus globale du large réseau d'interaction des protéines ayant un rôle à jouer dans la signalisation des récepteurs opioïdes. Par contre, une des faiblesses que partagent ces techniques d'identification protéiques est qu'il est très difficile de caractériser les composantes temporelles et dynamiques des interactions détectées. En effet, bien que l'identification du protéome d'une cible d'intérêt ne demande pas nécessairement de comprendre à quel moment cette interaction se produit, ni la dynamique de celle-ci, la compréhension du contexte temporel et spatial de ces interactions reste néanmoins fondamentale afin de bien comprendre leurs rôles (Scott & Pawson, 2009).

Nous nous sommes donc intéressés à l'application de la technologie APEX2, couplée aux récepteurs opioïdes mu et delta, afin d'identifier les partenaires protéiques potentiels de ces récepteurs et caractériser ces interactions. APEX2 a déjà été utilisé afin d'interroger les différentes protéines engagées dans le trafic du DOP et du récepteur  $\beta$ 2-adrénérrique (Lobingier et al., 2017), ainsi que celui du récepteur à l'angiotensine II (Paek et al., 2017). De plus en plus d'études montrent qu'il existe une certaine colocalisation de MOP et DOP, notamment au niveau des ganglions de la base (Bardoni et al., 2014; Rau et al., 2005; H.-B. Wang et al., 2010), la moelle épinière (Ivone Gomes et al., 2004) et

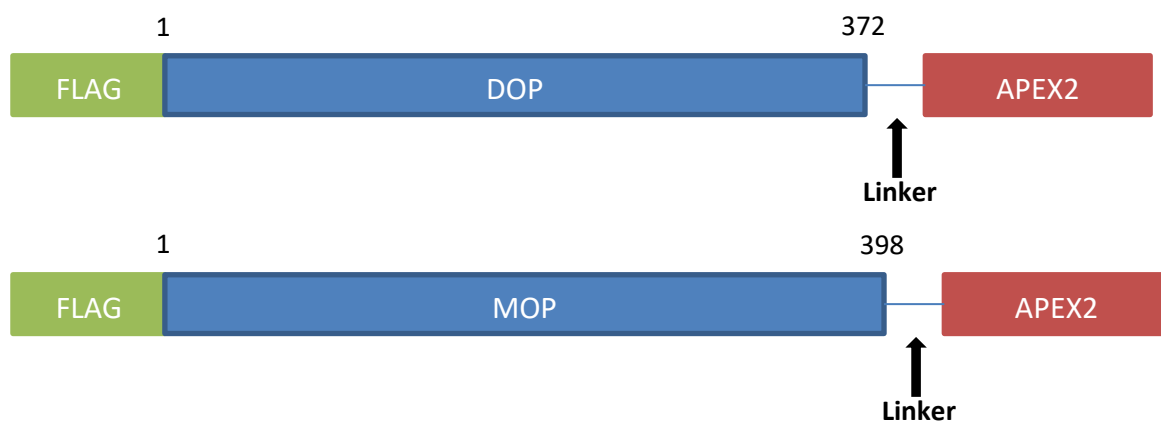
dans certains autres endroits limités du cerveau (Gupta et al., 2010; Kivell et al., 2004; Pedersen et al., 2011). Cette colocalisation du MOP et du DOP ouvre la porte à la question de l'hétérodimérisation de ces récepteurs. Des expériences *in vitro* ont préalablement montré que ces deux récepteurs, lorsque co-exprimés, pouvaient interagir ensemble (George et al., 2000; I. Gomes et al., 2000; Ivone Gomes et al., 2004). Plus récemment, d'autres groupes ont montré que cette interaction entre MOP et DOP était non seulement possible *in cellulo* et *in vivo* (Derouiche et al., 2018; Li-Wei et al., 2002), mais aussi que le complexe protéique ainsi formé possédait sa propre signalisation intracellulaire, avec une activation des protéines G et de la  $\beta$ -arrestine différentes des récepteurs seuls (Ivone Gomes et al., 2013; Metcalf et al., 2012; Rozenfeld & Devi, 2007). L'hétérodimère MOP-DOP pourrait également avoir un trafic intracellulaire qui lui est propre. Une étude parue en 2011 a montré que MOP et DOP pouvait seulement se complexer lorsqu'ils étaient présents à la membrane plasmique (Milan-Lobo & Whistler, 2011). D'autre part, une autre étude a montré que l'hétérodimère MOP-DOP pouvait être présent à la membrane du réticulum endoplasmique, où il recrute les protéines  $G_{\alpha_z}$  (Hasbi et al., 2007). Finalement, certains agonistes (par exemple DAMGO, Deltorphine II, SNC80 et la méthadone) peuvent induire l'endocytose de MOP-DOP, alors que certains autres (par exemple DADPE) ne l'induisent pas (Décaillot et al., 2008).

Les récentes études sur la co-expression de MOP et DOP et les effets intracellulaires qui en découlent montrent qu'il existe fort probablement une signalisation biaisée possible permettant l'activation préférentielle d'une voie de signalisation donnée. Cette signalisation biaisée, combinée au lien étroit entre les différentes voies de signalisation et les effets secondaires (par exemple la tolérance et désensibilisation suite au recrutement des arrestines), souligne la pertinence d'identifier et caractériser les différents partenaires protéiques impliqués dans la signalisation du MOP, DOP et de leur hétérodimère. Notre hypothèse est qu'avec la technologie APEX2 et la spectrométrie de masse, nous serons capables d'identifier des différences au niveau des protéines interagissant avec le MOP et le DOP dans leur état basal ainsi que lors de leur stimulation avec des agonistes. Nous pensons également que la co-expression du MOP et du DOP affectera les protéines détectées, et que ces différences dans les patrons d'interactions aiguillonneront la recherche future sur MOP- DOP. Cette hypothèse est supportée par



plusieurs études récentes qui se sont intéressées à la signalisation de l'hétérodimère MOP-DOP. Ces études ont montré que MOP-DOP élargissait le spectre de réponses cellulaires en comparaison aux récepteurs seuls, résultant en une amélioration de l'analgésie induite par la morphine (Ivone Gomes et al., 2004) et jouait un rôle au niveau des effets secondaires comme le développement de la tolérance analgésique (Gupta et al., 2010; He et al., 2011). De plus, certains ligands synthétiques comme la série MDAN (Daniels et al., 2005; Harvey et al., 2012) ciblant l'hétéromère MOP-DOP ont déjà été identifiés et un agoniste MOP-DOP biaisé, soit le CYM51010, a même été rapporté (Gomes et al., 2013). Mon projet s'inscrit donc dans le continuum de la recherche visant à élucider les effets physiologiques de l'hétérodimère MOP-DOP, ainsi que ceux des récepteurs seuls, dans leur état actif et inactif.

Les objectifs de mon projet étaient multiples. Le premier objectif était le clonage de deux récepteurs chimères, soient les récepteurs opioïdes mu et delta, avec l'enzyme APEX2 en portion C-terminale de ceux-ci, et la caractérisation de ceux-ci. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode de mutagenèse dirigée, nous permettant de cloner directement APEX2 en C terminal des deux récepteurs, séparé par un lien flexible d'acides aminés (Lobingier et al., 2017).



**Figure 2: Représentation schématique des constructions Flag MOP-APEX2 et Flag DOP-APEX2. Les constructions ne sont pas à l'échelle. *Linker* : I – E – F – S – G – S.**

Nous souhaitons par la suite vérifier que ces constructions étaient toujours bien exprimées dans un modèle cellulaire transitoire ainsi que fonctionnel. Pour ce faire, j'ai réalisé des immunobuvardages sur l'étiquette FLAG, ainsi que des essais de MAPK. Par la suite, j'ai vérifié la capacité d'APEX2 à biotinyler les protéines interagissant avec MOP et DOP par des essais de biotinylation, suivi par l'isolation de celles-ci, puis la visualisation par immunobuvardage. Le deuxième objectif de mon projet était l'identification des protéines biotinylées par APEX2. Pour ce faire, les échantillons de protéines biotinylées ont été envoyés à la plateforme de spectrométrie de masse de la FMSS, où les différentes protéines biotinylées ont pu être identifiées. Finalement, le dernier objectif de mon projet était la confirmation de l'interaction des protéines identifiées, ainsi que la caractérisation de celles-ci. Cet objectif est en cours de complétion, et fera l'objet de la maîtrise d'une étudiante actuellement en stage au laboratoire. Des résultats préliminaires ont toutefois déjà été obtenus, notamment par des essais de Co-IP.

## 2 Matériel et Méthodes

### 2.1 Culture Cellulaire

#### 2.1.1 Mise en culture et passage des différentstypes de cellules

Les cellules HEK293 et NG108-15 sont mises en culture dans un Petri de 10 cm avec 10 mL de milieu (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ; Wisent, Multicell) préchauffé à 37°C et complémenté avec 10% de sérum fœtal bovin et 1% d'un mélange de pénicilline/streptavidine (+1% hypoxanthine, aminopterin, thymidine, dans le cas des cellules NG108-15). Les lavages sont effectués avec 3 mL de *phosphate-buffered saline* 1X (Wisent) préchauffé tandis que les cellules sont décollées à l'aide de 1 mL de trypsine (Wisent) et resuspendues dans 10 mL total avec du DMEM supplémenté. Dans le cas des cellules HEK293 et NG108-15 stables, elles doivent être supplémentées avec de la généticine (G418). Les concentrations de G418 utilisées pour le maintien des lignées stables des cellules HEK293 et NG108-15 étaient 300 µg/mL et 500 µg/mL, respectivement. La majorité des expériences présentées dans mon mémoire ont été réalisées dans des cellules HEK293 transfectées de façon transitoire. Des cellules neuronales NG108-15, hybride entre un neuroblastome de souris et un gliome de rat, ont

également été utilisées dans les expériences de spectrométrie de masse. Les cellules NG108-15 présentent l'avantage d'exprimer le récepteur opioïde delta de façon endogène (P. Y. Law et al., 1983), en plus d'être plus physiologiquement pertinent que les cellules HEK293 puisqu'elles possèdent des caractéristiques neuronales.

### 2.1.2 Réalisation des lignées stables NG108-15

Les différentes lignées stables ont été réalisées dans des cellules HEK293 et NG108-15. Les constructions (pcDNA3 Flag DOP-APEX2 ou pcDNA3 Flag MOP-APEX2) ont été transfectées avec la Lipofectamine 3000 selon les recommandations de la compagnie. L'antibiotique de sélection G418 (400 mg/ml) a été ensuite ajouté au milieu de culture des cellules 48 heures post transfection. Au cours des jours suivants, le milieu de culture a été changé régulièrement (tout en conservant le G418) pour éliminer les cellules mortes jusqu'au stade d'apercevoir de petits amas cellulaires isolés dans le Petri, représentant la division des cellules-filles issues d'une cellule unique. Plusieurs clones ont été isolés dans des Petri séparés contenant systématiquement l'antibiotique de sélection (100 mg/ml de G418). À confluence, les cellules ont été congelées dans du diméthylsulfoxyde et conservées dans de l'azote liquide.

### 2.1.3 Transfection

Pour la majorité des essais de Co-IP ainsi que lors des expériences de MAPK, l'agent de transfection X-tremeGENE HP (Roche) fut le plus utilisé. On utilise 1 Petri de 6cm par condition et 3 µg d'ADN pour les CO-IP et les MAPK. On mélange tout d'abord l'agent transfectant, dans un ratio agent : ADN de 1 : 1, avec de l'OPTI-MEM, un milieu recommandé pour la plupart des agents de transfection et qui nécessite moins d'ajout de suppléments, dans un volume suffisant pour tous les échantillons (200µL d'OPTI-MEM par condition). Ensuite, on répartit ces mêmes volumes dans les nouveaux tubes contenant l'ADN et on laisse incuber 20 minutes sous la hotte. Finalement, on ajoute le contenu de chaque tube à son Petri correspondant, préalablementensemencé la veille avec le nombre de cellules souhaité (1 million de cellules), on remue ensuite les Petri à quelques répétitions pour bien répandre la solution et on remet dans l'incubateur à 37°C pour 48h. Quelques expériences ont été réalisées avec la Lipofectamine 3000 (ThermoFischer) comme agent de transfection. Dans ce cas, le protocole recommandé par la compagnie a été utilisé, avec un ratio agent : ADN de 2 : 1.

## 2.2 Immunobuvardage et co-immunoprécipitation

### 2.2.1 Récolte des cellules, extraction des protéines et immunoprécipitation

Les cellules HEK293/NG108-15 stables ou transitoires sontensemencées dans des Petri de 6 cm à un compte de 1 million de cellules. Au jour 2, un total de 3 µg d'ADN des différentes constructions est transfecté en utilisant soit X-tremeGENE HP ou Lipofectamine 3000 tel que décrit en 2.3.2. On laisse le tout incubé 48h puis, au jour 4, les cellules sont récoltées pour en extraire les protéines. Tout d'abord, le milieu est aspiré et les cellules sont lavées avec du PBS 1X froid. Ensuite, les cellules sont grattées dans du PBS 1X EDTA 2 mM/EGTA 2 mM. Les cellules sont par la suite centrifugées à 3500 rpm pendant 1 minute à 4°C. Le surnageant est aspiré et le culot est resuspendu dans 300 µL de tampon de lyse RIPA modifié (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8.0, 1% NP-40, 0,5% sodium déoxycholate, 0,1% SDS, 10 mM Na<sub>4</sub>PP et 5 mM EDTA) supplémenté d'inhibiteurs de protéases (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets). Le tout est bien mélangé et incubé pendant 1 heure avec rotation à 4°C. Puis, les lysats sont centrifugés à 13 000 rpm pendant 20 minutes et le culot est retiré pour être jeté. Les échantillons sont ensuite dosés et on récolte 30 µL (10%) du total auquel on ajoute 10 µL de tampon Laemmli 4X. Les échantillons sont ensuite incubés avec 1 µL d'anticorps FlagM2 (1:300 ; Sigma Aldrich) jusqu'au lendemain avec rotation à 4°C. Au jour 4, on poursuit l'immunoprécipitation en ajoutant 30 µL du mélange de billes A/G Sépharose (GE Healthcare) pendant 60 minutes avec rotation à 4°C. Ensuite, on centrifuge à 4°C à 3000 rpm pendant 1 minute le mélange. On aspire le surnageant et on lave 3 fois les billes avec le tampon de lyse. Finalement, on aspire le surnageant du dernier lavage et on ajoute 40 µL de tampon Laemmli 4X aux billes pour analyser les échantillons par gel SDS-PAGE.

### 2.2.2 Immunobuvardage

Des gels 10% acrylamide sont préparés. Les gels sont migrés à 150 V pendant 80 minutes puis transférés sur membrane de nitrocellulose à 400 mA (constant) pendant 1 heure. Les membranes sont ensuite bloquées avec du TBS-Tween 0,1% + Lait 5% pendant environ 30 minutes. Pendant le blocage, les anticorps primaires sont préparés dans la même solution que le blocage et les membranes sont incubées dans 3 mL de cette solution dans des pochettes jusqu'au lendemain avec agitation à 4°C. Normalement, la majorité des

anticorps utilisés au laboratoire sont validés à une dilution 1 :1000 (anti-FLAG), mais certains ont une meilleure affinité et demandent des dilutions plus élevées : anti-HA HRP (1 :3000), anti-myc HRP (1 :6000) (voir tableau 4 en annexe pour la liste des anticorps). Le lendemain, les membranes sont lavées 3 fois 10 minutes avec du TBS-Tween 0,1% puis incubées dans une solution de TBS-Tween 0,1% avec 5% lait contenant l'anticorps secondaire (souris ou lapin) couplé à la peroxydase de raifort (HRP) 1 : 5000 pendant 1 heure avec agitation à température pièce. Les membranes sont finalement lavées encore 3 fois 10 minutes avec du TBS-Tween 0,1% et révélées par électrochimiluminescence (ECL) (GE Healthcare). Lorsque les membranes doivent être révélées avec un autre anticorps, par exemple anti-actine, elles sont décapées avec du NaOH 0,4 M deux fois 10 minutes avec agitation. On rince brièvement avec de l'eau et on lave 5 minutes au TBS-Tween 0,1%. On bloque à nouveau pendant environ 10 minutes et on répète les étapes à partir de l'incubation de l'anticorps primaire jusqu'à la révélation.

## 2.3 Essais de MAPK

Afin de déterminer si DOP-APEX2 et MOP-APEX2 étaient capable d'activer une voie de signalisation sous l'effet d'un agoniste, j'ai réalisé un test d'activation des MAPK ERK1/2. Au jour 1, les cellules HEK293/NG108-15 stables ou transitoires sont ensemencées dans des Petri de 6 cm à un compte de 1 million de cellules. Au jour 2, un total de 3 µg d'ADN des différentes constructions est transfecté. Au jour 4, les cellules étaient traitées avec de la Deltorphine II ou du DAMGO en fonction du récepteur transfectées, à une concentration finale de 1 µM pendant 0, 1, 3, 5, 8, 10, 15, 30 et 60 minutes, à 37°C. Pour arrêter la stimulation et stabiliser le système, les cellules ont été lavées avec du tampon Hank's Buffered Salin (130 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 2,3 mM CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,98 mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 5 mM HEPES et 0,5 mM EGTA) à 4°C puis incubées 10 minutes sur glace dans du tampon de stabilisation (HBS supplémenté de 0,1 µM de staurosporine, 1 mM d'orthovanadate de sodium ainsi que de pastilles d'inhibiteurs de protéases Complete mini sans EDTA). Les cellules sont ensuite lysées dans 150 µL de tampon de lyse (HEPES 2,5 mM, 1% Triton X-100, Staurosporine 1 uM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM dans ddH<sub>2</sub>O) supplémenté en inhibiteurs de protéases pendant 30 minutes. Les lysats sont

ensuite centrifugés 10 minutes à 12 000 rpm, à 4°C. La quantité de protéines présente dans le surnageant a été dosée par la méthode de Bradford afin d'utiliser 20 µg de protéines par condition. Les protéines ont ensuite été dénaturées dans du tampon Laemmli 4X dilué à concentration finale 1X pendant 5 minutes à 100°C avant d'être analysées par immunobuvardage ou congelée à -20°C pour utilisation ultérieure.

## 2.4 Biotinylation APEX2

Les différentes constructions ont été surexprimées pendant 60 h avant d'ajouter de labiotine-phénol (500 µM, biotine tyramide, Iris Biotech) au milieu de culture pendant 30 min à 37°C comme décrit précédemment par d'autres (Dumont et al., 2019; Hung et al., 2016; Lobingier et al., 2017). Les cellules transfectées étaient ensuite stimulées avec de la deltorphine II (pour les cellules transfectées DOP) ou du DAMGO (pour les cellules transfectées MOP) à une concentration finale de 1 µM pendant 30 min, suivi d'une incubation de 1 min avec du peroxyde d'hydrogène (2 mM) afin de permettre la biotinylation par APEX2. La réaction a ensuite été arrêtée en aspirant le milieu contenant le peroxyde d'hydrogène, puis trois lavages successifs avec un tampon de PBS froid contenant des inhibiteurs de biotinylation (azide de sodium 10mM, ascorbate de sodium 10mM et trolox 5mM). Les cellules sont ensuite récoltées puis lysées dans un tampon RIPA froid (50 mM Tris-HCl à pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% de désoxycholate de sodium, 0,1% SDS, 1 mM DTT, et EDTA 5 mM complété par des inhibiteurs de protéases et de phosphatases de Bioutil ainsi que des inhibiteurs de biotinylation). Les cellules sont ensuite soumises aux ultrasons trois fois (10sec de sonication suivi de 30sec de pause) directement dans le RIPA. Les lysats sont ensuite centrifugés à 13 000g, 10 minutes, à 4°C, puis le surnageant est récupéré.

Des quantités égales de protéines (750 µg) ont été utilisées pour chaque condition des essais de biotinylation APEX2. Les échantillons de protéines biotinylées sont mélangés avec des billes de streptavidine Sepharose High Performance (GE Healthcare) et incubés pendant la nuit à 4°C. Après incubation, les billes sont lavées trois fois avec du tampon RIPA froid contenant des inhibiteurs de protéases et 5 fois avec  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (20mM). Les protéines sont ensuite réduites avec du DTT (10mM) pendant 30 minutes à 60°C, puis alkylées avec de l'iodoacétamide (15mM) pendant 1h. La réaction d'alkylation est ensuite arrêtée avec du DTT (1 M) et 50ng de trypsine de qualité spectrométrie de masse (Trypsin

gold, Promega) qu'on ajoute aux tubes pour incuber une nuit, sous agitation constante à 37°C. Les peptides clivés sont ensuite extraits avec 1% d'acide formique suivi d'une autre extraction avec 60% d'acide trifluoroacétique (TFA) et 1% d'acide formique. Les échantillons sont ensuite séchés dans une centrifugeuse sous vide et remis en suspension dans une solution 0,1% d'acide trifluoroacétique. Les échantillons sont ensuite dessalés en utilisant des embouts Zip C18 (ZTC18S096, Thermo Fisher), puis remis en suspension dans une solution 1% acide formique.

## 2.5 Spectrométrie de masse (LC-MS/MS)

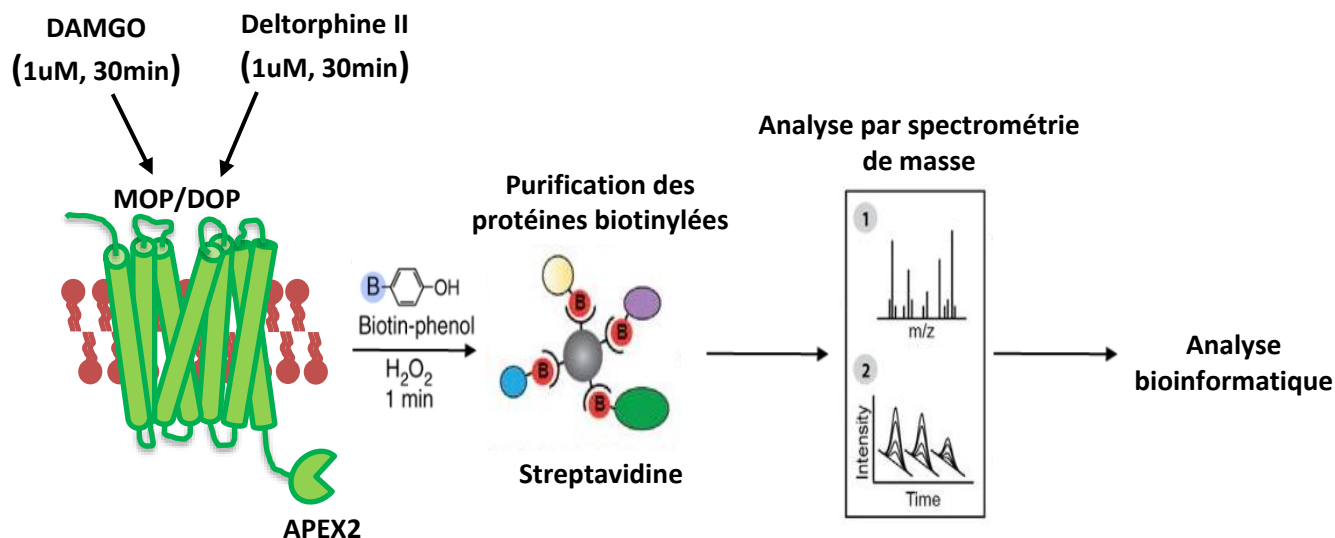
Pour chaque expérience distincte, les échantillons ont été chargés dans un système HPLC Dionex Ultimate 3000 nano comme décrit par d'autres (Dubois et al., 2016). Les peptides (10 µl, ~ 2µg) ont été remis en suspension dans de l'acide formique (1% v/v), chargés à un débit constant de 4 µl/min sur une colonne piège (colonne Acclaim PepMap100C18, 0,3 mmid x 5mm, Thermo Fisher), puis élués. Les échantillons ont été chargés sur une nano-colonne PepMap C18 (75µl x 50cm, Thermo Fisher) pendant 4h avec débit constant de 200nl/min et un gradient linéaire de 5 à 35% de solvant B (90% d'acétonitrile, 0,1% acide formique). Les peptides sont ensuite électropulvérisés dans un spectromètre de masse Orbitrap Qexactive (Thermo Fisher) par une source EasySpray avec une tension de pulvérisation de 2,0 kV et la température de la colonne à 40°C. L'acquisition de spectres MS à balayage complet (m / x 350-1600) a été réalisée avec une résolution de 70 000 en utilisant 1 000 000 d'ions. Les peptides utilisés pour les spectres MS/MS étaient basés sur les 10 pics les plus élevés obtenus par fragmentation par dissociation collisionnelle à plus haute énergie. La résolution pour le MS/MS a été fixée à 17 500 pour 50 000 ions, et l'énergie pour la collision normalisée a été fixée à 35%. Un maximum de 250 ms pour les balayages complets et 60ms pour les balayages MS/MS a été défini pour le temps d'injection. La version 2.2 SP1.48 de Xcalibur a été utilisée pour générer l'acquisition de données.

## 2.6 Analyse bioinformatique

La quantification des protéines a été réalisée en utilisant le logiciel MaxQuant (Cox & Mann, 2008) en mode quantification sans étiquette (LFQ). Les fichiers bruts ont été comparés aux bases de données de rat et de souris de UNIPROT dans le cas des échantillons issus des cellules NG108-15, et celle de rat seul lorsque les échantillons

provenaient de cellules HEK293. Le seuil minimum de découverte des peptides et des protéines a été fixé à 0,05. Un seuil minimal de 3 peptides uniques et une couverture de 10% minimale ont été ajoutés à l'analyse pour éliminer les protéines non spécifiques. Les intensités LFQ de toutes les conditions ont été comparées au contrôle approprié (par exemple FLAG DOP APEX2 ou FLAG DOP APEX2 stimulé) et le facteur d'augmentation/diminution minimum a été fixé à 1,5 et 0,5, respectivement.





**Figure 3: Représentation schématique illustrant le continuum technique d'identification des partenaires protéiques avec APEX2.**

## 2.7 Transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET)

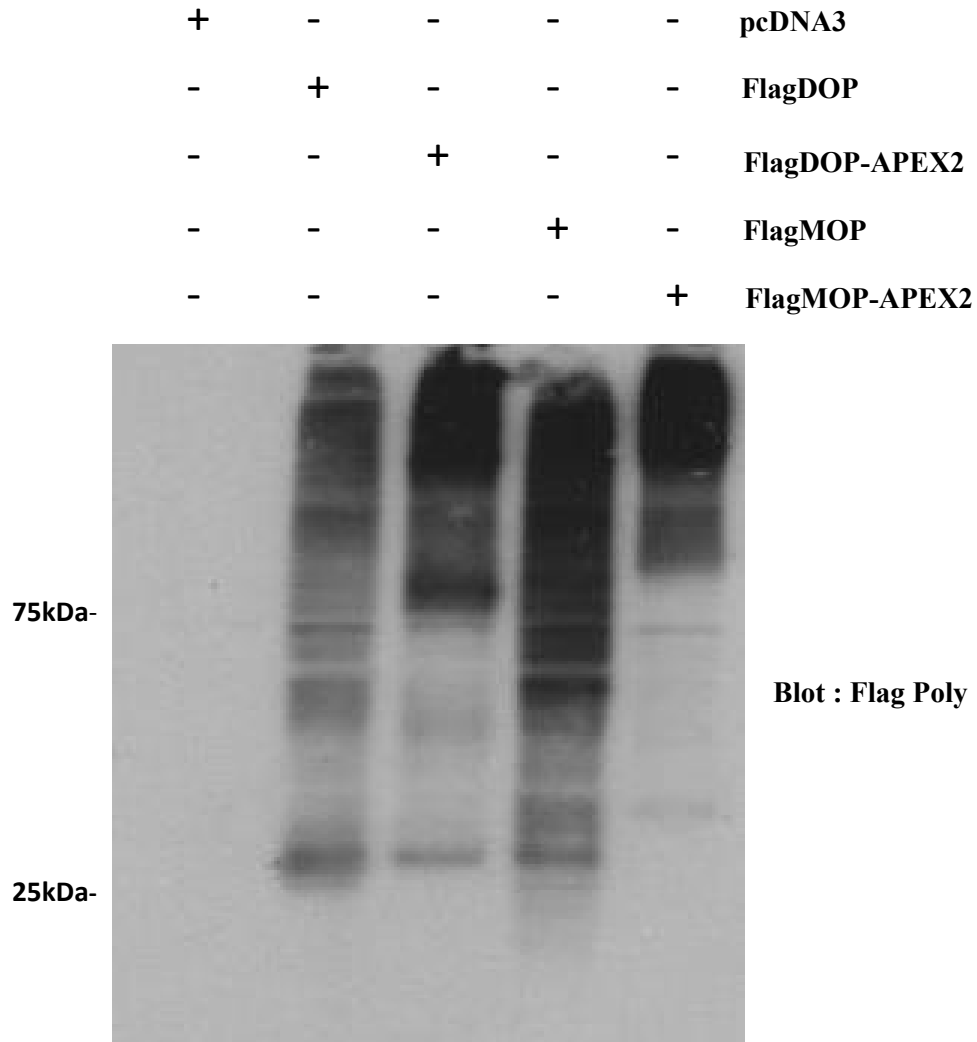
Au jour 1, des cellules HEK293 sont ensemencées dans des plaques à 6 puits à un compte de 500 000 cellules par puits. Au jour 2, le biosenseur désiré est transfecté à l'aide de l'agent PEI (ratio PEI : ADN de 3 :1) en suivant le protocole donné par le fabricant. Au jour 3, les cellules sont transférées dans une plaque 96-puits après avoir été lavées au PBS 1X, décollées avec de la trypsine, puis ensemencées à un compte de 75 000 cellules par puits dans cette nouvelle plaque. Au jour 4, le tampon pour le BRET (10 mM HEPES, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 4,2 mM KCl, 146 mM NaCl et 5,5 mM glucose) est chauffé et les ligands sont préparés à une concentration de 10<sup>-5</sup>M. Les cellules sont ensuite préparées en remplaçant le milieu par 80 µL de tampon BRET. Dans le cas où on veut voir une évolution dans le temps, on prépare ensuite le volume nécessaire pour la coelentérazine 400A à 50 µM. On ajoute 10 µL de ce mélange par puits pour avoir 5 µM final par puits. On établit ensuite la ligne de base en lisant la plaque pendant 2 minutes avec des lectures toutes les 30 secondes. On ajoute ensuite 10 µL de ligand 10X, généralement à 10<sup>-6</sup>M final, ou du tampon BRET pour les points non stimulés. On effectue ensuite des lectures toutes les 30 secondes ou 1 minute pendant 15 minutes. On analyse tout avec le ratio de BRET accepteur sur donneur au cours du temps. Dans le cas où on veut voir le point final, on ajoute 10 µL de ligand 10X et on incube à 37°C pendant un temps dépendant du biosenseur utilisé. La coelentérazine est ajoutée de la

même façon, puis la lecture est prise immédiatement suivant son ajout. On analyse ensuite le ratio de BRET accepteur sur donneur comparé à la concentration logarithmique de ligand.

### 3 Résultats

#### 3.1 Caractérisation des constructions chimères

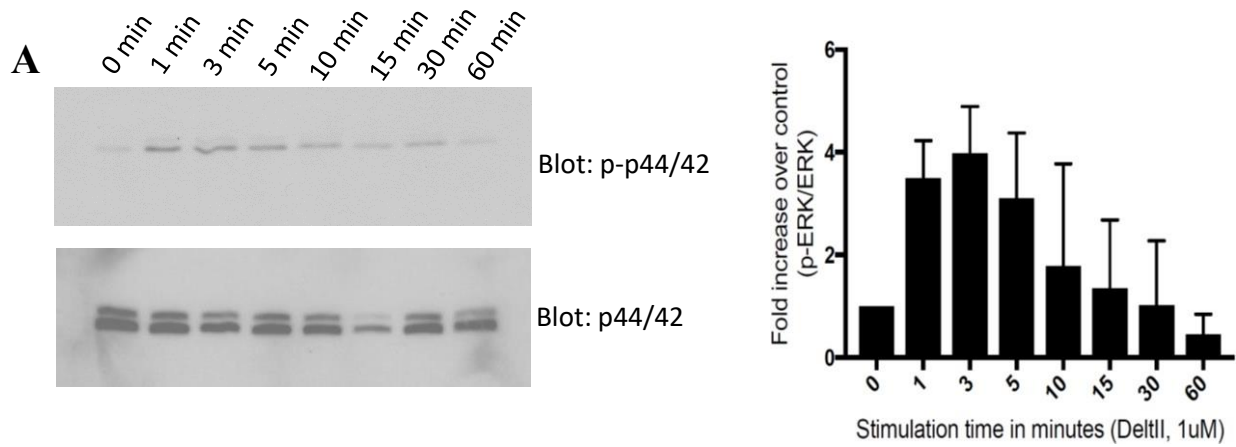
Puisque APEX2 est une protéine de 27kDa, il était important de déterminer si son ajout en C-terminal des constructions MOP et DOP allait entraver leur expression. L'ajout d'APEX2 en C-terminal de certains RCPG, dont DOP, a déjà été réalisé par d'autres groupes (Awoniyi et al., 2020; Lobingier et al., 2017; Paek et al., 2017) et n'entravait pas l'expression de ces récepteurs. Par contre, APEX2 n'a jamais été combiné au MOP, à ma connaissance. Afin de valider l'expression des différentes chimères, des cellules HEK293 ont été transfectées avec les différentes constructions pcDNA3, FlagDOP, FlagDOP-APEX2, FlagMOP et FlagMOP-APEX2. Un immunobuvardage a ensuite été réalisé sur les protéines extraites des cellules transfectées à l'aide d'un anticorps Flag, ciblant l'étiquette moléculaire présente sur chacune des constructions, mis à part le vecteur vide pcDNA3 (contrôle négatif). Les protéines ont ensuite été migrées sur des gels de polyacrylamide 10% avant d'être transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les anticorps Flag associés aux étiquettes ont ensuite été révélés à l'aide d'anticorps anti-lapin couplés à HRP. Comme on peut le voir dans la figure 4, la colonne contenant la construction pcDNA3 sans l'étiquette Flag est la seule colonne dans laquelle aucune protéine n'est visualisée. Les colonnes 2 et 4 contenant FlagDOP et FlagMOP, respectivement, présentent des patrons de bandes typiques lors de la visualisation du DOP et du MOP avec un anticorps Flag. Les colonnes 3 et 5 contenant FlagDOP-APEX2 et FlagMOP-APEX2, respectivement, présentent des patrons de bandes semblables à ceux des colonnes des constructions homologues non couplées à APEX2, mais avec un poids moléculaire plus élevé dû à l'enzyme de 27kDa. Il est important de noter que plusieurs bandes de poids moléculaires inférieurs sont présentes sur la figure. Celles-ci seront discutées plus en détails dans la section 4.1.1 de la discussion.



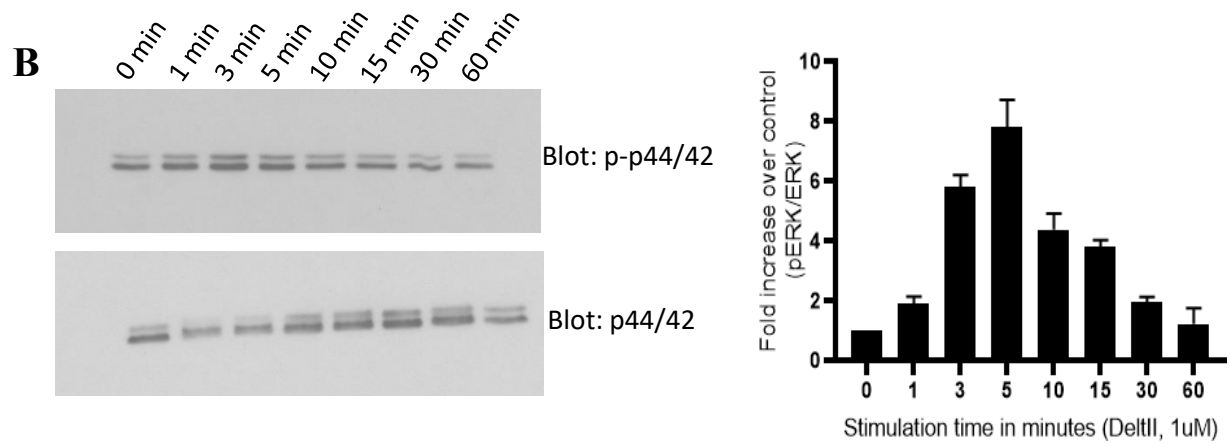
**Figure 4: Vérification de l'expression des différentes constructions APEX2 par immunobuvardage.** Des cellules HEK293 ont été transfectées avec les constructions pcDNA3, FlagDOP, FlagDOP-APEX2, FlagMOP ou FlagMOP-APEX2. Les cellules ont été lysées 48h post-transfection et l'immunobuvardage a été effectué avec l'anticorps Flag poly lapin, puis révélé avec un anticorps anti-lapin couplé à HRP. Résultats représentatifs de quatre expériences indépendantes.

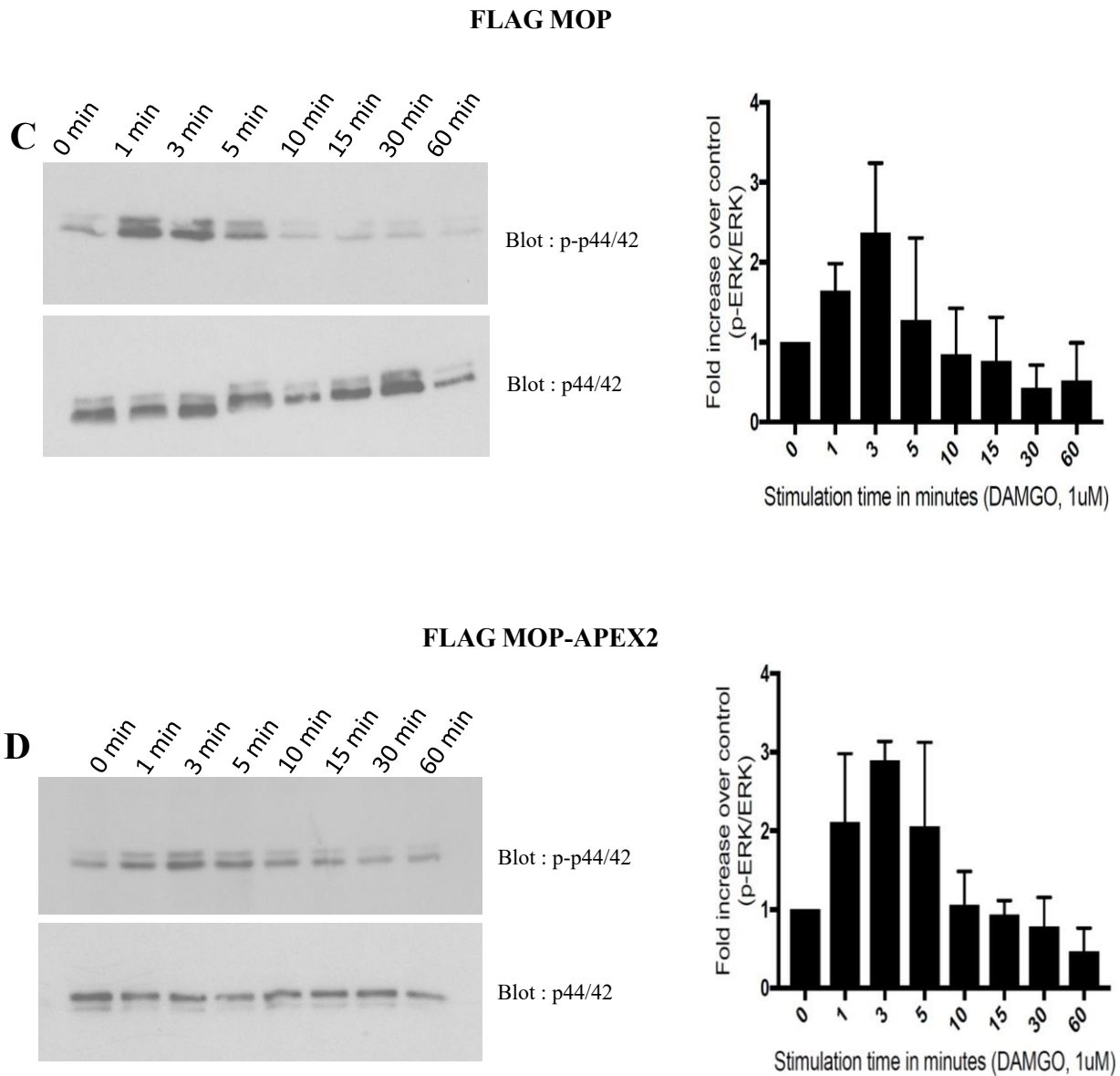
Après avoir vérifié que l'ajout d'APEX2 en C-terminale du MOP et du DOP n'empêchait pas leur expression dans des cellules HEK293, nous souhaitons nous assurer que la fonctionnalité des récepteurs chimères n'était pas réprimée. Pour ce faire, nous avons fait des tests de cinétique d'activation de la voie des MAPK. Des cellules HEK293 ont été transfectées avec FlagDOP, FlagDOP-APEX2, FlagMOP ou FlagMOP-APEX2. 48h après la transfection, les cellules ont été stimulées à rebours par de la deltorphine II pour les cellules transfectées avec le récepteur delta, et avec du DAMGO lorsque c'étaient des cellules transfectées avec le récepteur mu (0, 1, 3, 5, 10, 15, 30 et 60 minutes). Les cellules ont ensuite été lysées, puis les protéines séparées et analysées par SDS-PAGE avec des anticorps p-p44/42 pour évaluer les niveaux de phosphorylation des kinases p44/42, puis les protéines ont été révélées avec un anticorps anti-lapin couplé à HRP. Un anticorps anti-p44/42 a ensuite été utilisé afin de visualiser la quantité totale de MAPK présent dans l'échantillon, permettant de faire un ratio et quantifier l'activation des kinases.

FLAG DOP



FLAG DOP-APEX2

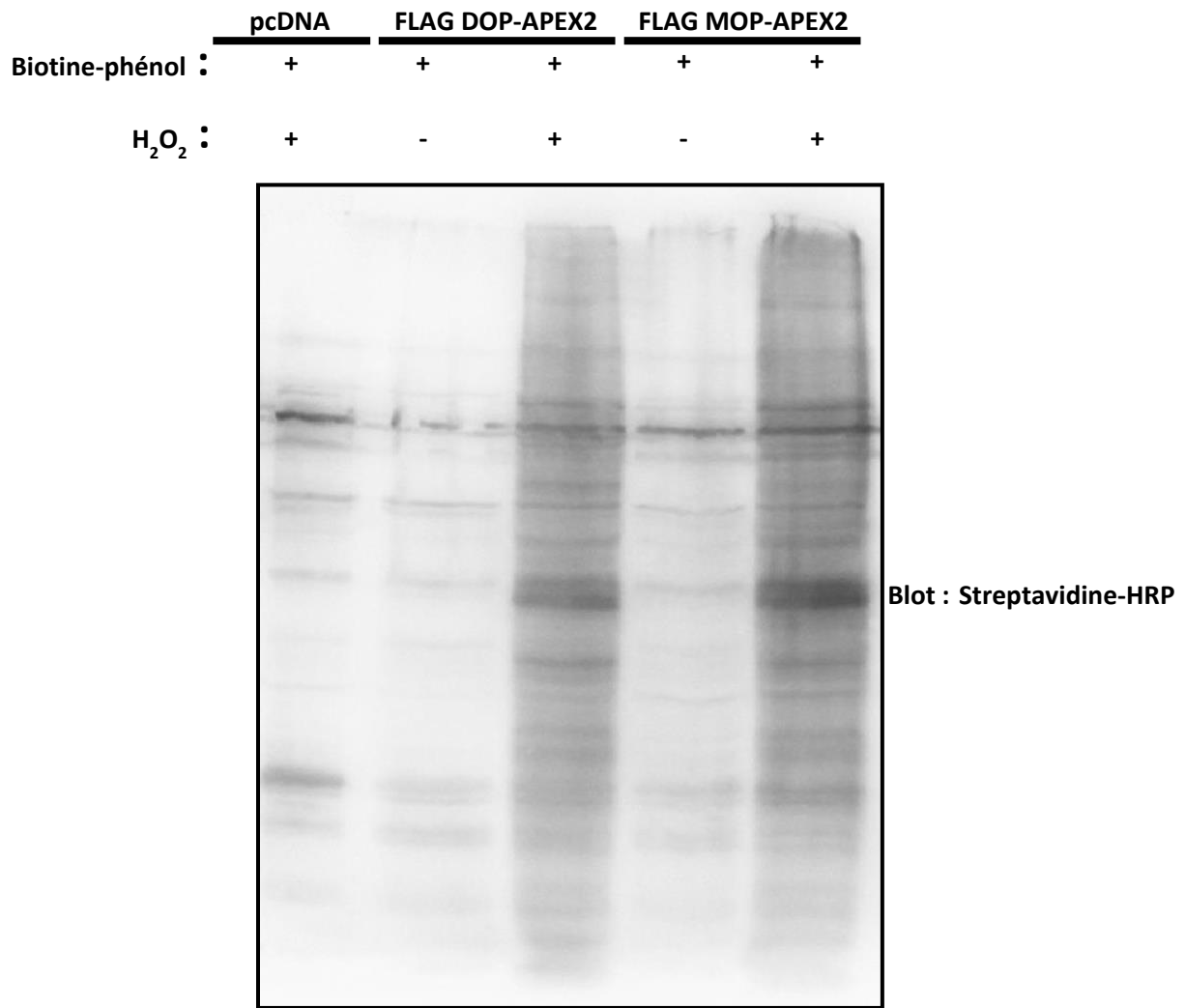




**Figure 5: Activation de la voie des MAPK lors de la stimulation des constructions FD, FDA, FM et FMA.** Des cellules HEK293 ont été transfectées avec les constructions Flag DOP (A), Flag DOP-APEX2 (B), Flag MOP (C) ou Flag MOP-APEX2 (D). 48h post-transfection, les cellules ont été traitées à des temps différents avec du DAMGO (FM, FMA) ou de la deltorphine II (DeltII) (FD, FDA), ou un véhicule dans le cas du puit 1. Les cellules ont ensuite été lysées, puis l'activation des p44/42 a été détectée par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps anti-p42/44 phosphorylé ou d'un anticorps anti-p42/44 pour mesurer les ERK1/2 totaux. Les ERK1/2 totaux agissent comme contrôle de la quantité de protéines déposée par puits. Les graphiques représentent la quantification densitométrique (moyenne  $\pm$  SEM) des niveaux de phosphorylation des ERK1/2 par ImageJ. Cette figure est représentative de trois expériences indépendantes.

Puisque la stimulation des récepteurs FDA et FMA semble activer la voie des MAPK avec une cinétique d'activation similaire à celle décrite dans la littérature (Trapaidze et al., 2000), nous avons conclu que les récepteurs étaient toujours fonctionnels, malgré l'addition d'APEX2 en C-terminal de ceux-ci. Il est important de noter que je n'ai fait aucun test permettant de visualiser la localisation intracellulaire des récepteurs chimères, mais que l'apparente stimulation des récepteurs par des agonistes peptidergiques ne pénétrant pas la membrane plasmique suggère qu'au moins une certaine proportion des récepteurs est exportée à la membrane.

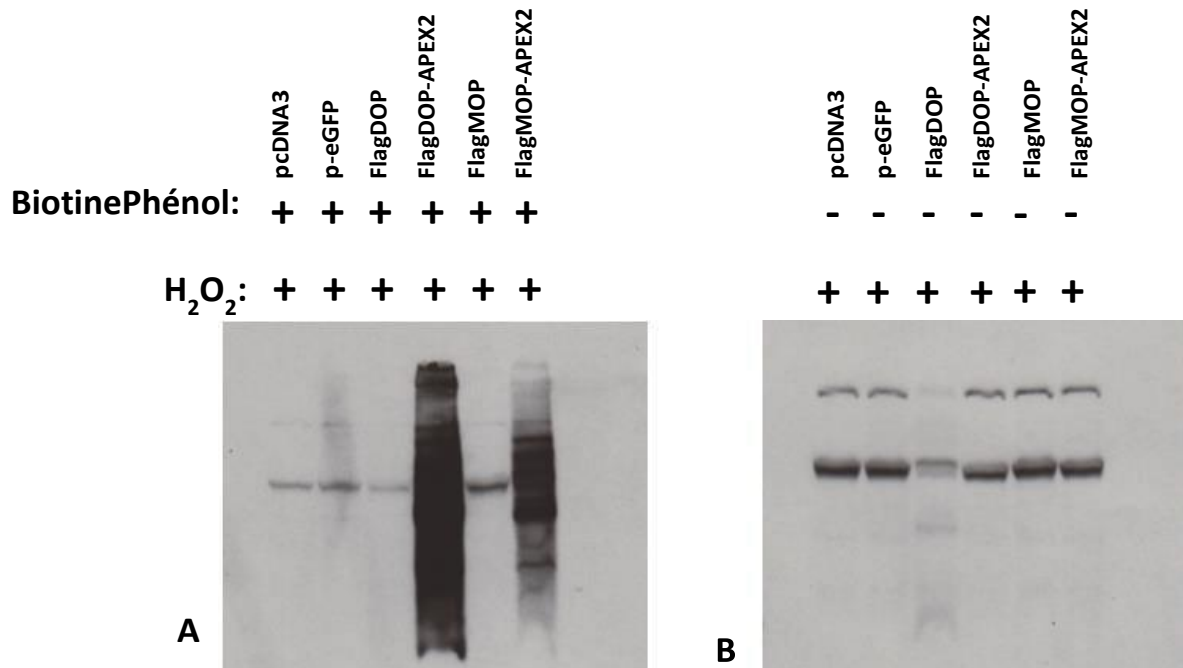
L'étape suivante pour la caractérisation des constructions était de vérifier si APEX2 était fonctionnel et pouvait bel et bien biotinyler les protéines adjacentes aux récepteurs auxquels il est couplé, et ce, de façon spécifique. Pour répondre à cette question, j'ai réalisé des essais de biotinylation, dans laquelle j'activais APEX2 par l'addition de peroxyde d'hydrogène directement dans le milieu de culture de mes cellules, alors que le peroxyde était remplacé par le véhicule (PBS) dans mes contrôles.



**Figure 6: La biotinylation des protéines à proximité des récepteurs opioïdes mu et delta par APEX2 dépend du peroxyde d'hydrogène.** Des cellules HEK293 ont été transfectées avec les constructions FDA (colonnes 2 et 3) ou FMA (colonnes 4 et 5). 48h post-transfection, les cellules ont été incubées dans du milieu de culture contenant de la biotine-phénol (500µM, 30mins), avant l'addition de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2mM, 1min) dans les colonnes 1, 3 et 5 afin d'activer APEX2. Les colonnes 2 et 4 ont reçu l'addition de véhicule (PBS) à la place du peroxyde d'hydrogène. Les lysats ont ensuite été analysés par SDS-PAGE, avant d'être visualisés par l'utilisation de la streptavidine couplée à HRP.



Maintenant que nous avons confirmé que la biotinylation APEX2 dépend de la présence de  $H_2O_2$ , nous avons voulu vérifier si elle dépendait également de la présence de biotine-phénol. Pour tester cette hypothèse, j'ai réalisé la même expérience de biotinylation que précédemment (Figure 6), en modulant cette fois-ci la présence ou non de la biotine-phénol dans le milieu d'incubation des cellules pendant 30 minutes. Les cellules non exposées à la biotine-phénol sont à la place incubées dans un milieu de culture complet, identique aux autres, sans biotine-phénol. Lorsque combiné, les résultats de ces deux expériences (Figures 6 et 7) montrent que la biotinylation observée est le résultat de l'activation d'APEX2 et dépend de la présence concomitante de biotine-phénol et de peroxyde d'hydrogène, tel que décrit précédemment dans la littérature.



**Figure 7: La biotinylation des protéines à proximité des récepteurs opioïdes mu et delta dépend de la présence de biotine-phénol.** Des cellules HEK293 ont été transfectées avec les constructions pcDNA3, p-eGFP, FlagDOP, FlagDOP-APEX2, FlagMOP ainsi que FlagMOP-APEX2. Le milieu cellulaire a été substitué pour du DMEM complet contenant de la Biotine-Phénol (500 $\mu$ M, 30mins) pour tous les échantillons. Du peroxyde d'hydrogène (2mM, 1min) a été ajouté aux cellules de la figure A préalablement à la lyse, alors qu'un contrôle PBS a été ajouté aux cellules de la figure B. Les cellules ont ensuite été récoltées, lysées et ensuite analysées par SDS-PAGE avant d'être visualisées par l'utilisation de streptavidine couplée à HRP.

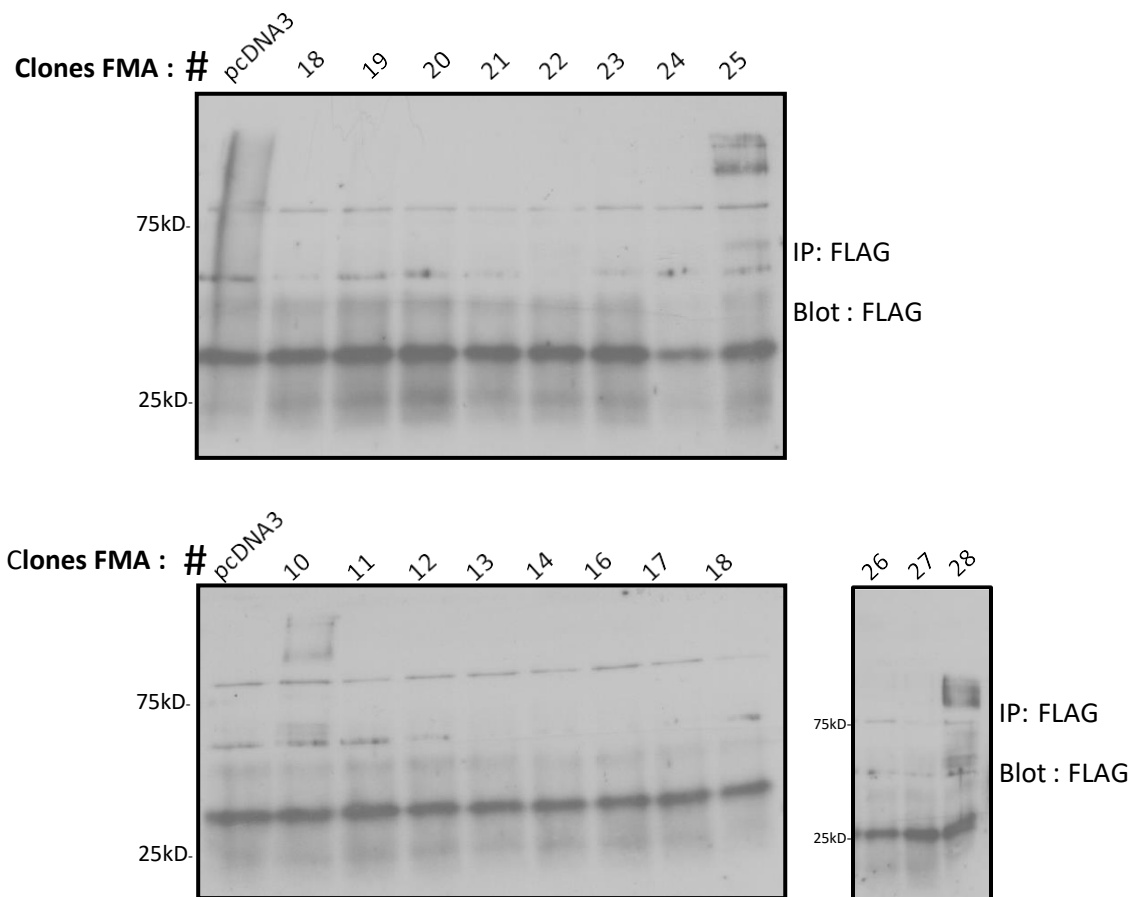
### 3.2 Génération de lignées cellulaires NG108-15 stables

Après avoir déterminé que mes constructions FDA et FMA étaient fonctionnelles autant au niveau de l'activité des récepteurs que celle d'APEX2, nous avons voulu transitionner dans un modèle physiologiquement plus pertinent, soit des lignées cellulaires NG108-15. Les NG108-15 sont des cellules neuronales et donc plus physiologiquement pertinentes pour l'étude des récepteurs aux opioïdes et de leurs partenaires d'interactions que les HEK293. Des cellules NG108-15 ont été transfectées avec la Lipofectamine 3000 selon les recommandations de la compagnie. L'antibiotique de sélection G418 (généticine ; 400 mg/ml) a été ensuite ajouté au milieu de culture des cellules 48 heures post transfection. Plusieurs clones ont ensuite été isolés dans des Petri 100mm. Les cellules ont ensuite été identifiées pour utilisation ultérieure. Plusieurs clones positifs pour les constructions FlagDOP et FlagMOP ont été identifiés par immunoprécipitation, mais seuls 1 et 2 clones positifs ont été identifiés pour les constructions FlagMOP-APEX2 et FlagDOP-APEX2, respectivement (tableau 1). Pour l'ensemble des clones testés, les niveaux d'expression ont été normalisés selon la quantité de protéines présente et ont été comparés au patron de bandes du contrôle négatif, soit des cellules NG108-15 exprimant de façon stable le vecteur vide pcDNA3.

	<b>FD</b>	<b>FM</b>	<b>FMA</b>	<b>FDA</b>
<b>Nombre de clones total</b>	26	31	25	28
<b>Clones positifs</b>	7	9	1	2
<b>Numéro des clones choisis</b>	13	3	25	28

**Tableau 1** : Nombre de clones totaux des différentes constructions stables pour les lignées cellulaires NG108-15

Suite à l'évaluation de l'expression de FMA et FDA par immunobuvardage, les clones #25 (FMA) et #28 (FDA) ont été sélectionnés. Une immunoprécipitation a été nécessaire afin d'identifier les clones positifs puisque l'expression des récepteurs n'était pas suffisante pour permettre leur visualisation lors de mon essai d'immunobuvardage sur des lysats cellulaires totaux. L'allure des cellules, leur vitesse de croissance ainsi que leur morphologie ont également été prises en compte lors de la sélection des clones. Les clones choisis ont ensuite été remis en culture dans plusieurs Petri, puis, lorsqu'à confluence, ceux-ci ont été congelés dans l'azote liquide pour utilisation ultérieure.



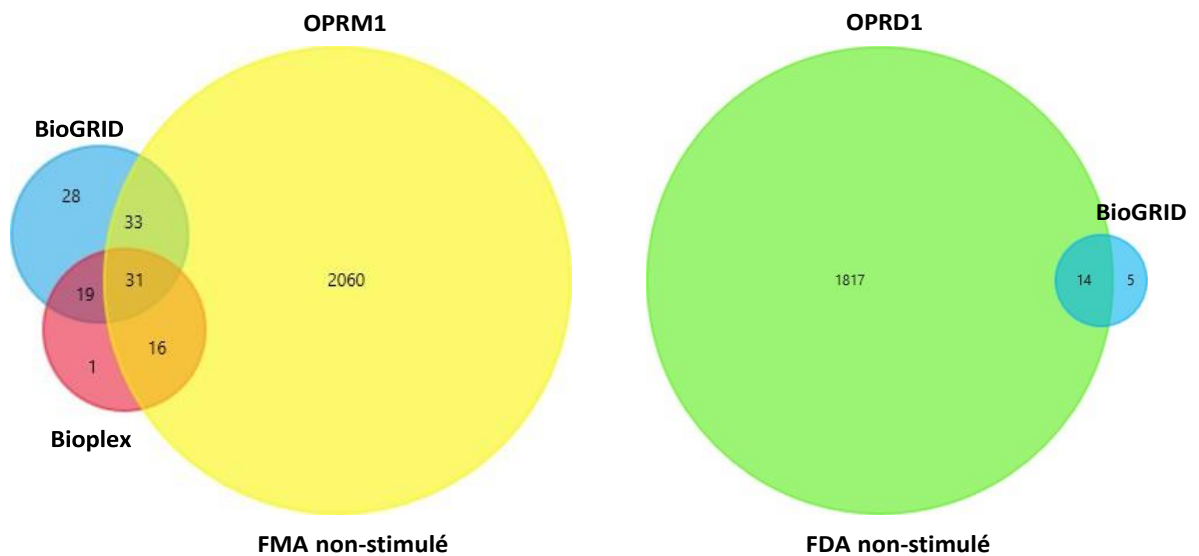
**Figure 8: Identification de clones positifs pour les constructions FDA et FMA par immunoprécipitation.** Les différents clones ayant poussés à partir d'une cellule unique exposée à l'antibiotique de sélection G418 ont été lysés, puis l'étiquette moléculaire Flag a été immunoprécipité par des billes d'agarose (A/G PLUS, Santa Cruz Biotechnology). Les protéines ont ensuite été analysées par SDS-PAGE en utilisant un anticorps anti-Flag provenant d'un lapin, puis un anticorps anti-lapin couplé à HRP.

### 3.3 Identification de partenaires d'interactions potentiels des récepteurs DOP et MOP par spectrométrie de masse

À partir d'un lysat de cellules HEK293, les protéines biotinylées par APEX2 ont été purifiées par des billes de streptavidine puis digérées avec de la trypsine avant d'être identifiées par spectrométrie de masse. Les peptides ainsi identifiés ont été triés, puis analysés par PANTHER et comparés aux bases de données UniProt, BioGRID et Bioplex (Figure 9). Ces plateformes permettent d'organiser les différentes protéines identifiées par classes, nous laissant les séparer en fonctions, par exemple, des voies de signalisation dans lesquelles elles sont impliquées. De plus, j'ai validé la présence, parmi les protéines identifiées, de certaines protéines qui sont bien connues comme étant des partenaires d'interactions des récepteurs MOP et DOP (Tableau 2). Dans le cadre de ma maîtrise, nous nous sommes principalement intéressés aux protéines impliquées dans la régulation du transport intracellulaire des récepteurs MOP et DOP puisque la compréhension des mécanismes responsables des différences de transport intracellulaire des récepteurs mu et delta est un sujet de recherche important du laboratoire (Beaudry et al., 2015; Charfi et al., 2018; Degrandmaison et al., 2020; St-Louis et al., 2017). Le Tableau 3 montre la liste des protéines identifiées par spectrométrie de masse (N=1) et qui sont impliquées dans le transport intracellulaire de certaines protéines. Seules les protéines présentant un facteur d'augmentation ou de diminution (condition stimulée sur non stimulée) de  $>1,5$  ou de  $<0,5$  pour les conditions FMA et FDA sont présentées. Le tableau 2 illustre l'identification de certaines protéines importantes dans la signalisation du DOP par différentes techniques et sera discuté plus en détail dans la section 4.2 de la discussion.

Protéines	LC-MS/MS <i>in vivo</i> (Degrandmaison et al., 2020)	Autre confirmation	Références
<b>Gao</b>	✓	Co-IP	(P.-Y. Law & Loh, 1999)
<b>Gai</b>	-	Co-IP	(P.-Y. Law & Loh, 1999)
<b>Calnexin</b>	✓	Co-IP	(Leskelä, 2007)
<b>COPA</b>	✓	LC-MS/MS	(St-Louis et al., 2017)
<b>CCT7</b>	✓	Co-IP	(Génier et al., 2016)
<b>ATP2A2</b>	✓	Co-IP	(Tuusa et al., 2010)

**Tableau 2:** Validation de la technique d'identification par APEX 2 de partenaires protéiques connus des récepteurs opioïdes mu et delta.



**Figure 9:** Comparaison des protéines identifiées par APEX 2 et LC-MS/MS avec les protéomes des récepteurs opioïdes mu et delta tels que défini par les bases de données BioGRID et Bioplex. OPRM1: *Opioid Receptor Mu 1*. OPRD1: *Opioid Receptor Delta 1*.

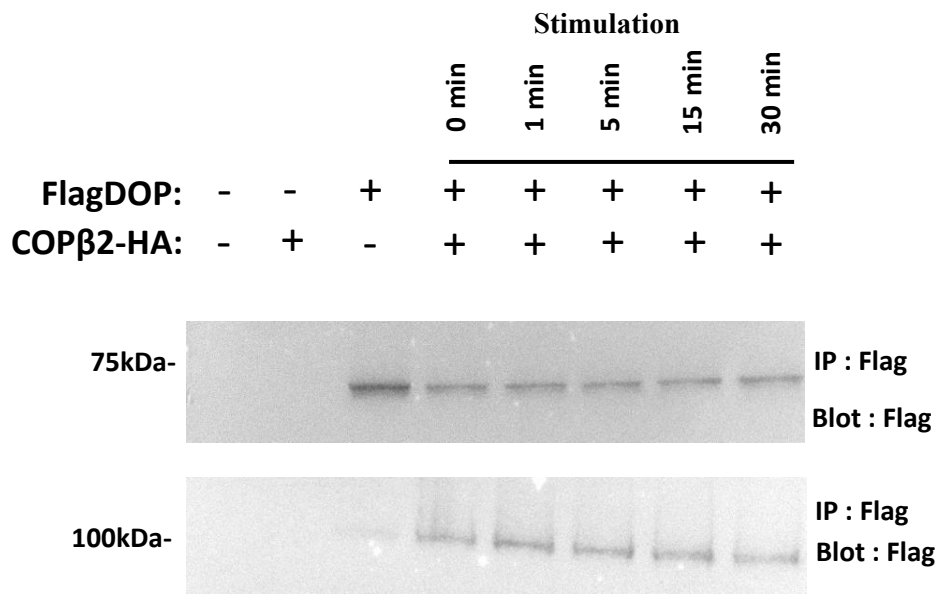
Nom du gène	FlagMOP-APEX2	FlagDOP-APEX2	Ratio d'intensité FMA	Ratio d'intensité FDA
<b>CNIH4</b>		X		75,35
RAB3C	X	X	0.09	38
ANXA7	X	X	0.03	4.82
FLOT2	X	X	0.3	4.39
FLOT1	X	X	0.17	4
PRKD1		X		3.79
ARF4		X		3.1
TMEM33		X		2.24
RAB13		X		2.18
PDCD6		X		1.99
ERLIN2		X		1.94
<b>COPB1</b>	X	X	0.08	0.5
HSPA8	X	X	0.36	0.499
RAB11A	X	X	0.3	0.47
SCAMP3	X	X	0.11	0.46
<b>COPB2</b>	X		0.43	
COPG1	X	X	0.12	0.42
RAB10		X		0.39
AP2M1	X	X	0.06	0.39
RAB5C		X		0.33
SEC11A		X		0.33
RAB21	X	X	0.24	0.32
AP1G1		X		0.29
COPZ1	X	X	0.2	0.26
RAB14	X	X	0.31	0.25
SEC23A	X	X	0.18	0.25
RAB5B		X		0.22
<b>PRAF2</b>		X		0.2
PACSIN2		X		0.15
COPE		X		0.15
TMED10		X		0.13
SEC13	X	X	0.07	0.12
AP3S1		X		0.12
SNX1	X	X	0.02	0.05

AP3M1		X		0.05
SEC22B		X		0.04
RAB1A		X		0.03
STON2	X		0.49	
AP1M1	X		0.39	
PDCD6IP	X		0.33	
RAB7A	X		0.33	
RAB6A	X		0.29	
COPA	X		0.28	
SMAP	X		0.25	
CLTC	X		0.24	
RAB1B	X		0.23	
CTTN	X		0.14	
RAB2A	X		0.13	
CHMP4B	X		0.12	
AP3D1	X		0.1	
AP2A2	X		0.06	
SEC23B	X		0.03	
CLINT1	X		0.03	
SAR1A	X		0.03	
SEC31A	X		0.02	

**Tableau 3:** Partenaires potentiels des récepteurs MOP et DOP identifiés par spectrométrie de masse. Cette analyse provient du marquage effectué dans des cellules HEK293.

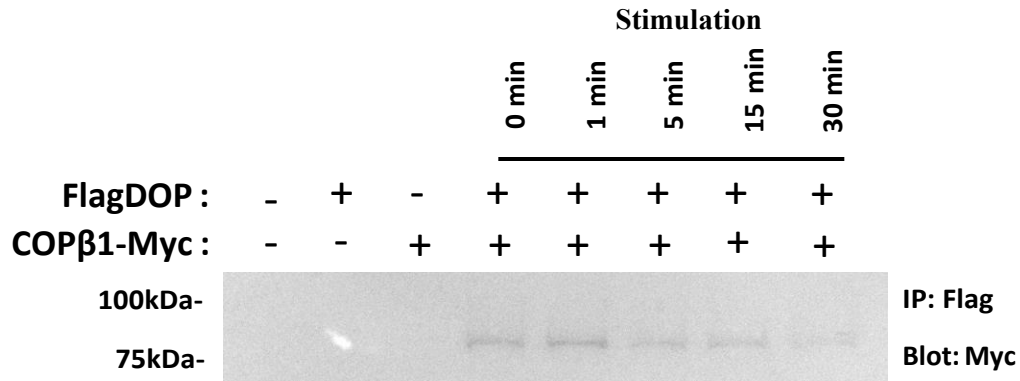
### 3.4 Les sous-unités COP $\beta$ 1 et COP $\beta$ 2 de COPI interagissent avec DOP dans des cellules HEK293

Suite à la filtration des données de spectrométrie de masse afin de faire ressortir les protéines impliquées dans le trafic intracellulaire, nous avons voulu valider les résultats obtenus en confirmant l'interaction entre le complexe protéique COPI, identifié dans le groupe FDA, et DOP. Cette interaction a déjà été montrée par le passé dans la littérature, ce qui me permette vérifier la validité des résultats obtenus par spectrométrie de masse. Pour ce faire, nous avons co-immunoprécipité DOP, puis avons révélé les étiquettes moléculaires présentes sur les sous-unités de COPI COP $\beta$ 1 et COP $\beta$ 2, soit Myc et HA, respectivement (Figures 10 et 11). Cette expérience a été réalisée dans un contexte de surexpression transitoire pour chacune des constructions utilisées.



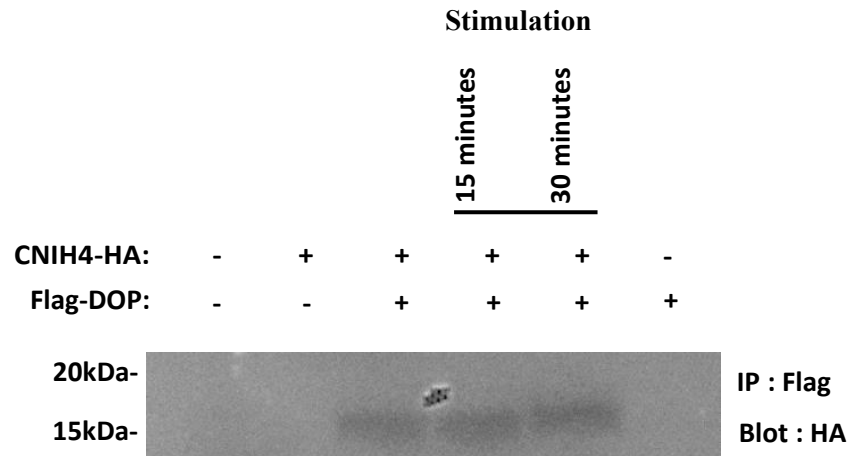
**Figure 10: La protéine COP $\beta$ 2 interagit avec DOP par Co-Immunoprécipitation dans des cellules HEK293 transfectées de façon transitoire.** Des cellules HEK293 ont été transfectées avec les constructions FlagDOP, COP $\beta$ 2-HA ou une co-transfection des deux constructions. Les cellules ont ensuite été stimulées par l'ajout de Deltorphine II directement dans le milieu de culture, à concentration finale de 1 $\mu$ M. Les cellules ont été lysées 48h post-transfection et la co-immunoprécipitation a été réalisée avec l'anticorps Flag M2. Les protéines sont ensuite révélées avec un anticorps contre leur étiquette moléculaire respective. Le panneau du haut représente la révélation du récepteur DOP et le panneau du bas révèle la protéine COP $\beta$ 2. Le résultat est représentatif d'au moins 3 expériences indépendantes.



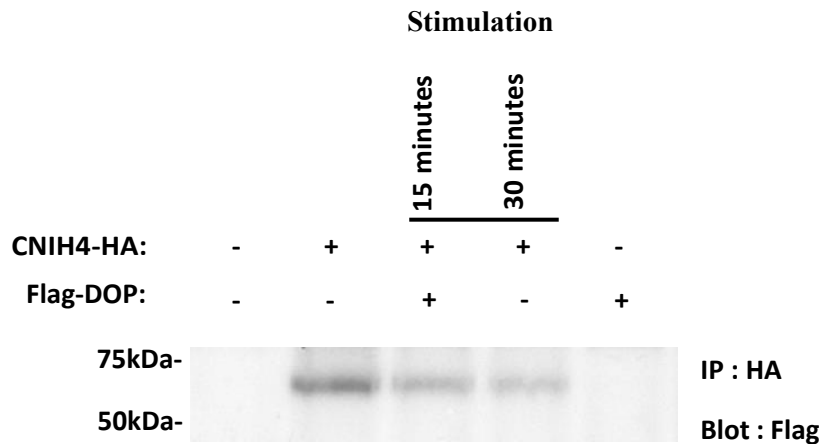


**Figure 11: La protéine COP $\beta$ 1 interagit avec le DOP par Co-Immunoprécipitation dans des cellules HEK293 transfectées de façon transitoire.** Des cellules HEK293 ont été transfectées avec les constructions FlagDOP, COP $\beta$ 1-Myc ou une co-transfection des deux constructions. Les cellules ont ensuite été stimulées par l'ajout de Deltorphine II directement dans le milieu de culture, à concentration finale de 1 $\mu$ M. Les cellules ont été lysées 48h post-transfection et la co-immunoprécipitation a été réalisée avec l'anticorps Flag M2. Les protéines sont ensuite révélées avec un anticorps contre leur étiquette moléculaire respective. Le panneau du haut représente la révélation du récepteur DOP et le panneau du bas révèle la protéine COP $\beta$ 1. Le résultat est représentatif d'au moins 3 expériences indépendantes.

Une protéine identifiée dans la spectrométrie de masse et qui semble particulièrement intéressante est la protéine CNIH4. En effet, cette protéine est ressortie très fortement dans l'expérience de biotinylation APEX2 et avait déjà été détectée par un collègue du laboratoire dans des essais de spectrométrie de masse issue de tissus de souris. Nous avons donc voulu confirmer l'interaction entre le récepteur delta et celle-ci par co-immunoprécipitation. Nous avons donc transfecté des cellules et immunoprécipité flag (DOP) et HA (CNIH4) (Figures 12 et 13, respectivement), puis avons révélé les étiquettes moléculaires respectives à la co-immunoprécipitation.



**Figure 12: La protéine CNIH4 interagit avec le récepteur delta par Co-Immunoprécipitation dans des cellules HEK293 transfectées de façon transitoire.** Des cellules HEK293 ont été transfectées avec les constructions FlagDOP, CNIH4-HA ou une co-transfection des deux constructions. Les cellules ont été lysées 48h post-transfection et la co-immunoprécipitation a été réalisée avec l'anticorps Flag M2. Les protéines sont ensuite révélées avec un anticorps contre l'étiquette moléculaire HA. La stimulation a été effectuée avec de la deltorphine II (1 $\mu$ M). Le résultat est représentatif de 2 expériences indépendantes.



**Figure 13: La protéine CNIH4 interagit avec le récepteur delta par Co-Immunoprécipitation dans des cellules HEK293 transfectées de façon transitoire.** Des cellules HEK293 ont été transfectées avec les constructions FlagDOP, CNIH4-HA ou une co-transfection des deux constructions. Les cellules ont été lysées 48h post-transfection et la co-immunoprécipitation a été réalisée avec l'anticorps HA. Les protéines sont ensuite révélées avec un anticorps dirigé contre l'étiquette moléculaire Flag. La stimulation a été effectuée avec de la deltorphine II (1 $\mu$ M). Le résultat est représentatif de 2 expériences indépendantes.

## 4 Discussion

L'ensemble de mes travaux de maîtrise visait le développement d'une technique d'étiquetage moléculaire qui nous permettrait de mieux comprendre les mécanismes de transmission des signaux intracellulaires des récepteurs opioïdes mu et delta, et l'identification éventuelle de partenaires protéiques potentiels de ceux-ci. Avec la crise des opioïdes qui fait rage en Amérique depuis déjà quelques années (Krausz & Jang, 2018), combinées aux effets secondaires reliés à l'utilisation de nos analgésiques les plus puissants et les plus couramment utilisés à ce jour (Rogers et al., 2013), il est important de continuer la recherche sur le développement de traitements plus efficaces contre la douleur. Comme mentionné en introduction, les effets indésirables liés à l'utilisation d'opioïdes sont fondamentalement dus aux cascades de signalisation engendrées lors de la stimulation de ceux-ci, et donc, ultimement, aux partenaires d'interaction impliqués (Al-Hasani & Bruchas, 2011). Pour nous permettre d'interroger les différents partenaires de DOP et MOP, nous avons souhaité utiliser la technique de biotinylation de proximité APEX2. Cette technique est bien documentée dans la littérature et a été montrée comme étant une approche puissante qui, lorsque combinée à la spectrométrie de masse, permet d'identifier de façon très spécifique les différentes protéines interagissant avec une cible d'intérêt (Bersuker & Olzmann, 2019; Singer-Krüger et al., 2020; Trinkle-Mulcahy, 2019), par exemple le récepteur DOP (Lobingier et al., 2017).

La signalisation des RCPGs dépend directement du nombre de récepteurs présent à la surface cellulaire, qui est lui-même dépendant du transport intracellulaire de ce récepteur. Le transport de la majorité des récepteurs couplés aux protéines G à la surface cellulaire demande plusieurs étapes critiques de contrôle de la qualité, ainsi que des modifications posttraductionnelles (MPT) dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Contrairement à la majorité des RCPGs, certains récepteurs ne sont pas repliés et exportés correctement à la surface cellulaire. En conséquence, une grande portion de ces récepteurs est retenue au niveau intracellulaire et empruntent la voie de la dégradation (Tao & Conn, 2014). Parmi ces récepteurs, on retrouve notamment les récepteurs dopaminergiques D1, les récepteurs sérotoninergiques 5-HT<sub>2A</sub>, les récepteurs

opioïdes delta (Petäjä-Repo et al., 2000) et plusieurs autres. Le bon repliement ainsi que la bonne maturation des récepteurs couplés aux protéines G dans le réticulum endoplasmique représentent les étapes clés limitantes de l'export des récepteurs à la membrane (Markkanen & Petäjä-Repo, 2008). Comme c'est le cas avec la grande majorité des RCPGs, les MPT des récepteurs aux opioïdes sont critiques pour leur bon repliement et transport à la surface. Parmi les MPT qui jouent des rôles clés dans la signalisation des récepteurs aux opioïdes, on retrouve la glycosylation, la lipidation (palmitoylation) la phosphorylation et l'ubiquitination.

La glycosylation est une réaction enzymatique consistant à lier de façon covalente un glucide à une chaîne peptidique. Il existe deux types de glycosylation, soit la liaison d'une molécule de sucre à un atome d'azote d'un résidu asparagine (N-glycosylation), ou bien la liaison d'une molécule de sucre à un atome d'oxygène d'une sérine ou d'une thréonine (O-glycosylation) (Ohtsubo & Marth, 2006). L'étape initiale de glycosylation est réalisée de façon co-translationnelle dans le réticulum endoplasmique, puis est suivie de la formation d'assemblages complexes de monosaccharides (glucides) dans l'appareil de Golgi. La glycosylation des récepteurs MOP et DOP est particulièrement importante puisqu'elle a été reliée à des différences d'affinités pour certains ligands (Bond et al., 1998; Miller et al., 2004), en plus d'être impliquée dans la dynamique d'expression des récepteurs à la membrane à l'état basal, et donc de l'abondance des récepteurs disponibles pour la signalisation (Ge et al., 2009; Huang et al., 2012; Markkanen & Petäjä-Repo, 2008). De façon intéressante, certaines études de mutants ne pouvant pas être glycosylés sur certains acides aminés ont montré qu'ils avaient un plus grand taux d'internalisation en comparaison avec les récepteurs de type sauvage (Markkanen & Petäjä-Repo, 2008). Prises ensemble, ces études suggèrent que la glycosylation peut affecter la signalisation et la maturation des récepteurs aux opioïdes.

Les modifications lipidiques se caractérisent par l'attachement covalent d'acides gras sur certaines régions distinctes de protéines. Il existe trois types de modifications par des acides gras : la N-myristoylation, la palmitoylation et l'isoprénnylation (Resh, 2006). Parmi celles-ci, la palmitoylation est celle qui a été le plus dûment étudiée chez

les RCPGs (Qanbar & Bouvier, 2003). La palmitoylation est un événement hautement dynamique qui dépend de l'activité des différentes acyltransférases et thioestérases qui la régulent. La palmitoylation des RCPGs joue un rôle très important dans leur ancrage aux différentes membranes cellulaires. Dans le cas de récepteurs aux opioïdes, la palmitoylation facilite l'homodimérisation et le couplage/activation des protéines G. De plus, certains mutants du récepteur mu présentant un profil de palmitoylation moindre que le récepteur sauvage ont montré une diminution de signalisation, notamment une diminution de l'activation de la voie des MAPK (Zheng et al., 2012). De façon similaire, la palmitoylation du récepteur delta est importante pour le trafic de celui-ci vers la membrane plasmique, alors qu'une diminution de la palmitoylation du DOP entraîne une diminution de son expression à la surface cellulaire (Petäjä-Repo et al., 2006).

La phosphorylation est l'une des MPT les plus fréquentes. La phosphorylation des RCPGs affecte leur dynamique de signalisation. Étant donné l'importance de la phosphorylation dans le contrôle d'une multitude de cascades de signalisation, il n'est pas surprenant qu'elle fasse l'objet d'un très grand nombre de recherches. Les sites de phosphorylation dans les récepteurs opioïdes sont majoritairement situés dans les boucles intracellulaires et la queue C-terminale de ceux-ci. La majorité des études sur l'effet de la phosphorylation de DOP et MOP ont particulièrement étudié l'effet de la phosphorylation sur certains résidus clés, impliqués notamment dans la modulation de la désensibilisation, le recyclage et l'analgésie (Arttamangkul et al., 2019; Kouhen et al., 2001), et ont montré que la phosphorylation a un rôle très important dans la régulation de chacun de ces aspects.

L'ubiquitination des récepteurs aux opioïdes est bien connue pour être impliquée dans la régulation de l'endocytose et de leur dégradation (Chaturvedi et al., 2001; Groer et al., 2011; Petäjä-Repo et al., 2001). Entre autres, le mauvais repliement du DOP ou du MOP peut entraîner leur ubiquitination et éventuellement leur dégradation par le protéasome. L'ubiquitination de MOP est ligand spécifique et suggère donc qu'elle pourrait avoir un rôle dans la signalisation biaisée de MOP (Hislop et al., 2011). Dans le cas de DOP, celui-ci a été décrit comme pouvant être ubiquitinylé dans différents

compartiments intracellulaires. Lors de la maturation de celui-ci, son ubiquitination agit comme un contrôle qualité; son mauvais repliement entraînera son ubiquitination, l'étiquetant essentiellement vers la voie de dégradation protéosomale (Petäjä-Repo et al., 2000).

Comme nous pouvons le voir, les MPT font partie intégrale du système de modulation de l'expression et du trafic intracellulaire des récepteurs aux opioïdes, et même de leur signalisation. Bien qu'étant la cible exhaustive de plusieurs études, l'ampleur des effets des MPT sur plusieurs récepteurs, dont les récepteurs opioïdes, reste encore floue. De plus, bien qu'expliquant en partie les différences notables dans l'expression et le transport du DOP et du MOP, il n'en reste pas moins que ces différences sont fondamentalement dues aux protéines qui interagissent avec ces récepteurs. En effet, bien que les MPT dictent les différentes protéines qui pourront ou non interagir avec nos récepteurs d'intérêts, ce sont ultimement ces protéines qui médient ces différences. En ce sens, mon projet de maîtrise visait à caractériser les protéomes spécifiques au MOP et au DOP, dans leur état basal, et suite à leur stimulation.

Bien que la détection et l'identification de partenaires protéiques de cibles d'intérêt soient cruciales pour nous aider à comprendre les rôles et les mécanismes de régulation de ces cibles d'intérêt (S. Han et al., 2017), les méthodes employées échouent bien souvent à détecter les interactions transitoires et/ou de faible intensité. La méthode de biotinylation de proximité par APEX2 propose l'avantage d'une détection potentiellement plus spécifique dû au « crosslinking » et au niveau de fractionnement protéique moindre, ainsi qu'une sensibilité accrue permettant la détection des interactions habituellement non détectées (transitoires et/ou de faibles intensités) (Loh et al., 2016). De plus, APEX2 permet la détection d'une multitude de protéines en un seul essai, contrairement à certaines autres techniques, par exemple la co-immunoprécipitation.

La première étape de mon projet était le clonage d'APEX2 en C-terminale du DOP et du MOP et la caractérisation de l'intégrité de ces constructions en transfectant les différentes constructions dans des cellules HEK293, puis en analysant les images par

immunobuvardage. Suite à leur caractérisation, nous avons procédé à la biotinylation, enrichissement puis identification par spectrométrie de masse des protéines interagissant avec DOP et MOP. Une analyse des différentes protéines identifiées de cette façon a ensuite été réalisée à l'aide de différents outils d'ontologie génique, facilitant ainsi l'identification de partenaires potentiels qui nous semblait intéressant. La technique d'identification par APEX2 a été confirmée par des co-immunoprécipitation sur COP $\beta$ 1 et COP $\beta$ 2, deux protéines partenaires de DOP et MOP bien caractérisées dans la littérature. Finalement, une protéine intéressante a été identifiée, et des tests afin de mieux la caractériser ont été entrepris et feront le sujet d'études futures dans le laboratoire.

## 4.1 Caractérisation des récepteurs FMA et FDA

### 4.1.1 Expression des constructions

Nous avons d'abord cloné APEX2 en C-terminal des constructions FlagDOP et FlagMOP de rat que nous possédions déjà au laboratoire. L'ajout d'un « linker » I-E-F-S-G-S (Figure 2) entre le récepteur et APEX2 est basé sur la construction FDA utilisée dans le laboratoire des docteurs Von Zastrow et Krogan (Lobingier et al., 2017). Les niveaux d'expression des constructions APEX2 ont été liés à la longueur du « linker » le séparant de la protéine d'intérêt (Sastri et al., 2017). Bien que l'expression du récepteur delta ne semblait pas être affectée par l'ajout d'APEX2 en C-terminal, tel que montré précédemment (Lobingier et al., 2017), celle du récepteur opioïde mu n'a jamais été testée dans des cellules HEK293. Pour cette raison, nous avons évalué l'expression des récepteurs par immunobuvardage sur l'étiquette Flag. Comme attendu, aucune bande n'a été détectée dans la colonne 1 du contrôle pcDNA3, alors qu'on observe dans les colonnes 2 et 4 des patrons de bandes typiques lors de la visualisation des récepteurs mu et delta. DOP et MOP ont des poids moléculaires respectifs de 41 et 46 kDa. Les autres bandes observées sont majoritairement le résultat de la glycosylation des récepteurs, témoignant de la maturation de ceux-ci (Petäjä-Repo et al., 2000 (Kasai et al., 2011)). Par contre, la concentration d'anticorps, la qualité des inhibiteurs de protéases ainsi que la condition des cellules lors de leur culture peuvent tous contribuer à cette présence de bandes de faibles poids moléculaires. L'optimisation des conditions expérimentales pourrait aider à diminuer la présence de

certaines de ces bandes. Conceptuellement parlant, il serait important d'optimiser les conditions expérimentales puisque des différences de dégradation observée dans les immunobuvardages pourraient signifier que l'ajout d'APEX2 à DOP et MOP modifie leur adressage et/ou maturation. Il est à noter que de plus en plus d'études montrent que DOP et MOP peuvent former des oligomères, et donc il est possible que certaines des bandes observées soient dues à l'oligomérisation des récepteurs, particulièrement dans le contexte où ils sont fortement surexprimés par la transfection (Ong & Cahill, 2014). Pour sa part, APEX2 possède un poids moléculaire non négligeable de 27 kDa (Lam et al., 2015), et cela est reflété dans le patron de bandes décalées vers le haut dans les colonnes 3 et 5, correspondant aux échantillons FDA et FMA, respectivement.

#### 4.1.2 Fonctionnalité des récepteurs

Le fait qu'on observe une expression des récepteurs lors des expériences d'immunobuvardage dans des cellules HEK293 ne signifie pas pour autant que les récepteurs sont fonctionnels. Pour tester leur fonctionnalité, nous avons fait des expériences d'activation des MAPK suite à la stimulation des récepteurs par des ligands peptidiques. Puisque les cellules NG108-15 expriment de façon endogène le récepteur DOP, nous avons choisi de mener ces expériences dans les cellules HEK293. Lors de la stimulation du DOP par la deltorphine II, des niveaux de phosphorylation des ERK1/2 ont été détectés, avec une cinétique d'activation semblable à celle décrite dans la littérature (Trapaidze et al., 2000). De façon similaire, l'activation du récepteur mu par l'agoniste sélectif DAMGO a mené à une augmentation de la phosphorylation des ERK1/2, avec une cinétique encore une fois relativement similaire à celle décrite dans la littérature (Trapaidze et al., 2000). L'analyse densitométrique par ImageJ montre que la cinétique d'activation des ERK1/2 est semblable entre les constructions FMA et FM, ainsi qu'entre les constructions FDA et FD.

#### 4.1.3 Fonctionnalité d'APEX2

La fonctionnalité apparente des récepteurs à engager la voie des MAPK n'étant pas gage de la fonctionnalité d'APEX2, nous avons voulu tester celle-ci par des



expériences de biotinylation, suivi d'une analyse SDS-PAGE et d'une révélation par un anticorps streptavidine-HRP (Figures 6 et 7). Dans les deux figures, une grande partie de la biotinylation observée est attribuée à la présence d'APEX2, comme l'indique la biotinylation beaucoup plus faible lors de l'omission du peroxyde d'hydrogène (Figure 6), et celle de la biotine-phénol (Figure 7). Dans les deux figures, nous pouvons remarquer que les conditions où APEX 2 est non-fonctionnel (en absence de peroxyde ou de biotine-phénol) présentent tout de même des patrons de biotinylation. Ceci est dû à la présence de plusieurs protéines biotinylées endogènes dans les HEK293 et est bien documenté dans la littérature (Jia et al., 2011).

Lorsque combinés, ces résultats appuient la pertinence de l'utilisation des constructions FlagMOP-APEX2 et FlagDOP-APEX2 dans la réalisation de mes travaux de maîtrise. En effet, l'expression des récepteurs mu et delta est maintenue suite au clonage en C-terminal d'APEX2 (Figure 2). De plus, les récepteurs des constructions FDA et FMA sont tous deux capables de recruter la voie des MAPK, comme le montrent les essais de cinétique de phosphorylation des ERK1/2, et sont bien adressés à la membrane lorsque l'on considère que les tests d'activation des MAPK ont été réalisés avec des agonistes peptidergiques ne traversant pas la membrane plasmique des cellules. Finalement, APEX2, dans mes constructions, est fonctionnel et a été montré comme étant capable de biotinyler de façon spécifique les protéines endogènes dans les cellules, et que notre méthode permettait l'enrichissement, la visualisation et l'éventuelle analyse par spectrométrie de masse des protéines ainsi étiquetées.

#### 4.1.4 Détection de nouveaux partenaires d'interactions potentiels de DOP et MOP par la méthode APEX2

Afin d'identifier des partenaires protéiques potentiels du DOP et MOP, avons réalisé une expérience de biotinylation par APEX2 dans des cellules HEK293 transfectées avec Flag DOP-APEX2 ou Flag MOP-APEX2 stimulées ou non par un agoniste sélectif approprié (Deltorphine II ou DAMGO) (Tableau 3, Figure 9). Les expériences de biotinylation ont également été réalisées dans des cellules NG108-15 transfectées de façon transitoire avec les mêmes constructions ainsi que dans des cellules exprimant MOP ou DOP de façon stable. Dû à un bruit de fond plus marqué dans les résultats de spectrométrie de masse de la biotinylation dans les cellules NG108-

15, ainsi qu'aux contraintes de temps, l'analyse subséquente a seulement été faite avec les résultats obtenus des expériences réalisées dans les cellules HEK293. Pour cette raison, seuls ces résultats seront abordés dans le cadre de mon mémoire. Au total, 2313 protéines différentes ont été identifiées à travers les 4 conditions (FDA, FDA stimulé, FMA, FMA stimulé) suite au triage des données brutes de spectrométrie de masse.

## 4.2 Validation de la technique

Suite à l'obtention des résultats de spectrométrie de masse, la prochaine étape était d'essayer de valider la technique. Comme il est très difficile de valider de façon quantitative les résultats, nous avons procédé par une approche multicentrique. Dans un premier temps, j'ai voulu me donner une idée de la validité des résultats obtenus en comparant l'ensemble des protéines identifiées par APEX2 avec différentes protéines bien connues comme interagissant à un moment ou à un autre avec DOP (Tableau 2). Le récepteur delta a été choisi puisqu'il est celui auquel le laboratoire s'intéresse le plus, et que de cette façon je pouvais comparer les protéines obtenues avec celles obtenues dans d'autres publications récentes du laboratoire, comme celle d'Étienne St-Louis (St-Louis et al., 2017) et Jade Degrandmaison (Degrandmaison et al., 2020). Les autres études citées sont des publications dans lesquelles différentes approches ont été utilisées afin d'identifier des partenaires protéiques du récepteur DOP. Il est particulièrement intéressant de noter que plusieurs des protéines identifiées dans mon expérience ont également été identifiées par Jade, dans un modèle animal avec des niveaux d'expression physiologique du DOP (souris FLAG-DOP *knockin*). La confirmation de la présence de certaines protéines partenaires du DOP dans les protéines identifiées par APEX2 suggère la fonctionnalité de la méthode et une certaine spécificité de celle-ci. Pour appuyer cette observation, j'ai comparé les protéines obtenues avec deux banques de données disponibles en ligne, soit les banques de données Bioplex et BioGRID. Bioplex est une banque de données regroupant l'ensemble de ces protéines identifiées par purification par affinité combinée à la spectrométrie de masse de toutes les protéines humaines accessibles. BioGRID est pour sa part une banque de données qui ratisse la littérature afin d'identifier les partenaires protéiques préalablement identifiées dans des publications afin de monter l'interactome d'un grand nombre de protéines humaines. Pour MOP, il y a une couverture de 58% des partenaires protéiques

obtenues avec BioGRID, et 70% de couverture des partenaires Bioplex, alors qu'on obtient une couverture de 74% des protéines partenaires identifiées par BioGRID pour DOP. Il est important de se rappeler que la technique APEX2 permet une identification de type « capture d'image », c'est-à-dire que la biotinylation se fait seulement lors de l'ajout de peroxyde d'hydrogène (1min). Ceci mène à la biotinylation des protéines adjacentes à la protéine de fusion en question qui interagissent pendant cette minute d'activité d'APEX2. Ceci est contrasté par l'aspect plus statique des partenaires identifiés par co-immunoprécipitation (Bioplex). De plus, il est important de noter que le type cellulaire dans lequel les expériences menant à l'identification de partenaires protéiques est crucial et peut mener à des différences notables d'interactome pour une même protéine. En ce sens, il est normal que la couverture protéique entre les protéines détectées dans mon expérience et celles identifiées par les banques de données ne soit pas identiques. L'absence d'interactome du DOP identifié par Bioplex est simplement dû au fait que DOP n'a pas encore été immunoprécipité et analysé par celle-ci au moment de la rédaction de mon mémoire.

#### 4.3 Confirmation des partenaires d'interaction COP $\beta$ 1/ COP $\beta$ 2 par co-immunoprécipitation

Une des grandes questions de recherche du laboratoire est l'élucidation des différences au niveau du contrôle et du transport intracellulaire entre le DOP et le MOP, notamment suite à leur stimulation par un agoniste. Nous avons donc voulu trier les résultats de spectrométrie de masse obtenus afin de nous aider dans l'identification de partenaires protéiques potentiellement impliqués dans le transport et le contrôle intracellulaire des récepteurs mu et delta. Pour ce faire, nous avons fait le ratio des intensités LFQ de la condition stimulée sur celle non stimulée. Ce ratio permet de faire ressortir les protéines en fonction de leurs abondances relatives et des différences dans leur niveau d'abondance suite à la stimulation des récepteurs. Seules les protéines ayant obtenues un ratio d'intensité supérieur ou égale à 1.5, ou inférieur ou égal à 0.5 ont été retenues, ce qui nous a permis de grandement réduire le nombre de protéines à analyser (de 2313 protéines à 491). Le rôle des protéines ayant été retenues a ensuite été identifié à l'aide de banques de données comme UNIPROT, nous permettant ainsi de trier les protéines en fonctions de leur implication dans différents processus intracellulaires tels que décrits dans la littérature. Celles potentiellement impliquées

dans le trafic des récepteurs MOP et DOP ont été retenues. Au final, 55 protéines ont été retenues.

Des 55 protéines retenues, il est intéressant de noter que plusieurs COP ont été détectées, dont les complexes protéiques COPI et COPII. Ces protéines sont formées de plusieurs sous-unités et tapissent les vésicules de transport de plusieurs protéines. COPI est principalement impliqué dans le transport rétrograde des protéines de la partie *cis* de l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique (Béthune et al., 2006). COPII, pour sa part, est impliqué dans le transport antérograde des vésicules de transport, soit le transport des vésicules vers la surface cellulaire. COPI est particulièrement intéressant puisque le laboratoire a montré par le passé que ce complexe protéique interagit avec DOP, expliquant en partie la rétention de celui-ci dans le réticulum endoplasmique (St-Louis et al., 2017). Il est important de souligner que mes résultats décrivent seulement un  $n=1$  et n'ont donc pas été soumis à une analyse statistique. Il sera donc important de répéter l'expérience jusqu'à l'obtention d'un  $N=3$  afin de pouvoir en tirer des analyses statistiques significatives. Bien que mes résultats de spectrométrie de masse ne soient issus que d'une seule expérience, ceux-ci reflètent une diminution d'intensité LFQ de la sous-unité  $\beta 1$  du complexe protéique COPI suite à la stimulation de DOP, ce qui pourrait se traduire par une perte d'interaction entre COPI et DOP. Afin de corroborer mes résultats de spectrométrie de masse, et suite aux résultats précédemment obtenus par Étienne St-Louis, j'ai fait la co-immunoprécipitation des sous-unités  $\beta 1$  et  $\beta 2$  de COPI avec DOP. Le choix de ces deux sous-unités est dû aux constructions déjà détenues dans le laboratoire, et parce qu'elles sont les deux sous-unités les mieux caractérisées dans la littérature. Mes résultats de co-IP montrent que les deux sous-unités de COPI interagissent avec DOP, indépendamment du temps de stimulation de DOP par la deltorphine II (Figures 6 et 7). Cependant, on remarque une perte d'interaction entre DOP et la sous-unité  $\beta 1$  de COPI en fonction du temps de stimulation. En effet, l'intensité de la bande COP $\beta 1$  est maximale lors de l'absence de stimulation, et diminue en fonction du temps de stimulation, avec un minimum d'intensité après 30 minutes de stimulation. Il est à noter que la vérification de l'expression totale et stable de COP $\beta 1$  devrait être effectuée à partir du lysat total dans les mêmes conditions expérimentales afin de valider qu'il s'agit effectivement d'une modulation dans le temps de l'interaction entre DOP et COP $\beta 1$ . La signification de cette perte apparente d'interaction entre les deux protéines pourrait être très

importante puisque ceci sous-entend que la stimulation par la deltorphine II de DOP pourrait augmenter la densité du récepteur à la surface cellulaire, dû à son interaction moindre avec COPI, dont le rôle principal est le transport rétrograde des vésicules de transport. Il est important par contre de se rappeler que ce résultat est seulement observé avec la sous-unité  $\beta 1$  de COPI, et que ce résultat ne reflète pas nécessairement le comportement du complexe COPI avec DOP. Parallèlement, le résultat des co-immunoprécipitations ajoute une autre dimension à la confirmation de la méthode d'identification protéique par APEX2.

#### 4.4 Comparaison des résultats de spectrométrie de masse avec ceux des professeurs Mark Von Zastrow et Nevan J Krogan

Tel que mentionné précédemment, les laboratoires des professeurs Von Zastrow et Krogan ont publiés un article en 2017 (Lobingier et al., 2017) dans lequel ils décrivent l'utilisation d'APEX2 afin d'identifier certains partenaires protéiques de différents RCPGs, dont DOP. Cependant, il existe certaines différences importantes à mentionner lorsque l'on souhaite comparer les résultats obtenus dans leurs expériences aux nôtres. Premièrement, puisqu'ils ont produit un triplicata de leurs expériences, ils ont pu utiliser SAINT, un algorithme de notation probabiliste, afin d'identifier les partenaires probables du DOP. De plus, ils ont utilisé un système de contrôles spatiaux en couplant APEX2 à certaines protéines se situant dans des compartiments cellulaires bien définis, tels que 2xFYVE pour les endosomes précoces et Lyn<sub>11</sub> pour la membrane plasmique. De cette façon, ils ont pu trier et éliminer un grand nombre de protéines faisant partie du bruit de fond. Malgré ces différences, il est intéressant de noter qu'il existe certaines similarités entre les protéines obtenues dans leurs expériences et les miennes. De façon intéressante, ils ont remarqué une augmentation du nombre de protéines impliquées dans l'ubiquitination des RCPGs en fonction du temps de stimulation, avec un maximum à 30 minutes de stimulation. Dans mes expériences, DOP était également stimulé pendant 30 minutes, et un grand nombre de protéines impliquées dans l'ubiquitination a également été détecté. En particulier, LAMP1, TOM1, VAMP8 et WWP2 ont tous été identifiés avec des ratios d'intensité supérieurs à la limite minimale fixée. Ces protéines sont connues comme ayant une fonction dans le tri endosomal et la régulation négative de certains autres récepteurs (Cheng et al., 2018; Jung et al., 2014; Marshall et al., 2015; Roach et al., 2021). Bien que mes efforts de recherches ne se soient pas concentrés sur ces protéines, la comparaison des différentes protéines identifiées par la technique APEX2 autant dans mes résultats que dans ceux des professeurs

Von Zastrow et Krogan pourrait s'avérer très pertinente afin de valider certains partenaires protéiques potentiels, et ainsi guider la recherche sur l'interactome de DOP.

#### 4.5 Identification du partenaire d'interaction potentiel CNIH4

Parmi toutes les protéines identifiées, la protéine cornichon homologue humaine (CNIH4) nous a semblé particulièrement intéressants dû à sa présence dans les résultats de spectrométrie de masse *in vivo* de Jade Degrandmaison (Degrandmaison et al., 2020) comme partenaire du DOP et à son ratio d'interaction grandement augmenté suite à la stimulation de DOP (Tableau 3). De plus, CNIH4 a seulement été identifié comme partenaire potentiel dans l'expérience de biotinylation APEX2 avec DOP, et non dans celui avec MOP. Très peu d'études se sont intéressées à CNIH4, avec une seule étude liante CNIH4 aux RCPGs à l'heure actuelle (Sauvageau et al., 2014). CNIH4 est une protéine appartenant à la famille des exportateurs de TGF $\alpha$ . Des études antérieures sur la Drosophile ont montré que les homologues de cornichon sont des protéines membranaires intégrales qui résident dans les vésicules qui bourgeonnent des sites de sortie du réticulum endoplasmique et dirige la cargaison sécrétoire vers la surface cellulaire (Bökel et al., 2006; Castro et al., 2007; Sauvageau et al., 2014). CNIH4 interagit sélectivement avec les RCPGs dans les voies de sécrétion précoces, notamment avec les formes immatures des RCPGs, et une surexpression de celle-ci a été liée à la rétention intracellulaire des RCPGs avec lesquelles CNIH4 interagit (Sauvageau et al., 2014). Par contre, les niveaux basaux d'expression de CNIH4 aident au transport antérograde des RCPGs vers la surface cellulaire. Il est intéressant de noter qu'une des théories les plus probantes expliquant l'augmentation du transport antérograde par CNIH4 serait par son interaction avec les protéines Sec23 et Sec24, deux composantes de COPII que j'ai identifié dans mon échantillon DOP, en spectrométrie de masse.

Afin de vérifier l'interaction de CNIH4 avec DOP observée en spectrométrie de masse, nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation, en précipitant d'abord le récepteur (Figure 12), puis en immunoprécipitant CNIH4. Dans les deux cas, nous observons une co-immunoprécipitation de CNIH4 (figure 12) et du récepteur (Figure 13), permettant de confirmer l'interaction entre les deux protéines. Il est important de souligner ici un des désavantages de la co-immunoprécipitation, c'est-à-dire l'impossibilité avec ces résultats de déterminer s'ils interagissent directement ou bien par l'intermédiaire d'un

complexe protéique. Au vu de la littérature, il semble plus probable qu'ils interagissent dans un complexe protéique avec d'autres protéines du manteau COPI et COPII (Sauvageau et al., 2014). De façon intéressante, dans les résultats de spectrométrie de masse, le ratio d'augmentation de la détection entre la condition non-stimulée et celle stimulée est très élevée (75,35), ce qui suggère une augmentation de l'interaction de CNIH4 avec DOP lors de la stimulation de celui-ci par la deltorphine II. Par contre, dans les expériences de co-IP, nous n'observons pas cette augmentation de l'interaction. Au contraire, dans la figure où CNIH4 a été immunoprécipitée (Figure 13), il semble y avoir une diminution de l'interaction entre les deux. Il est important de se rappeler que cette expérience a été réalisée avec des concentrations très élevées de protéines dû à la transfection transitoire. De plus, tel que rapportée par la littérature, une surexpression de CNIH4 pourrait diminuer l'expression de DOP à la membrane, limitant ainsi sa capacité à être stimulé par la deltorphine II, un agoniste peptidergique. Pour pallier à cette limitation, des lignées cellulaires stables exprimant FlagDOP et CNIH4 pourraient être réalisées. Par contre, des niveaux physiologiques de CNIH4 tels qu'exprimés par ces lignées stables pourraient présenter un nouveau défi soit la visualisation de CNIH4 sur blot. Une répétition des expériences de biotinylation par APEX2 afin d'obtenir un N plus élevé pourrait présenter la meilleure approche permettant de déterminer si l'interaction entre ces deux protéines est bel et bien augmentée suite à la stimulation de DOP.

Le transport antérograde du DOP, particulièrement en lien avec sa rétention dans le réticulum endoplasmique, reste à ce jour un sujet sommes toutes mal compris. Mes résultats, combinés aux études suggérant un rôle de CNIH4 dans la régulation du transport antérograde de certains RCPGs, soulignent l'importance de recherches plus approfondies sur la mécanique et la cinétique d'interaction entre ces deux protéines (Petäjä-Repo et al., 2000). La caractérisation du rôle de CNIH4 dans le transport antérograde du DOP pourrait nous permettre d'expliquer en partie les différences d'expression à la membrane entre MOP et DOP, ou encore offrir une nouvelle cible thérapeutique à exploiter. Une approche ciblant CNIH4 pourrait permettre une augmentation du transport antérograde du DOP, augmentant ainsi sa disponibilité à la surface cellulaire pour un ligand thérapeutique. Comme la faible disponibilité en condition basal du DOP à la surface cellulaire reste une des plus grandes faiblesses du DOP comme cible thérapeutique, cette approche pourrait offrir un moyen de

surmonter cet obstacle.

## 5 Conclusions et perspectives

Bien que faisant tous deux parties de la famille des récepteurs aux opioïdes, DOP et MOP ont chacun des caractéristiques bien particulières, notamment au niveau de leur trafic intracellulaire. Sous-jacentes à ces différences sont toute une panoplie de protéines interagissant avec ces récepteurs et permettant leur bon repliement, transport et signalisation. La caractérisation de ces protéines d'interactions est donc cruciale afin de pouvoir bien définir et comprendre les mécanismes d'actions et le comportement de DOP et MOP. Cependant, les techniques courantes de caractérisation des partenaires protéiques sont souvent limitées dans leur capacité à identifier les partenaires, particulièrement les partenaires d'interaction transitoires et de faible intensité. Mes travaux de maîtrise ont donc visé à mettre en place une approche permettant l'identification de partenaires protéiques fugaces. Dans un premier temps j'ai cloné l'enzyme APEX2 en C-terminal des constructions Flag-DOP et Flag-MOP, puis les ai caractérisés. J'ai montré que les constructions Flag-MOP APEX2 et Flag-DOP APEX2 étaient toutes les deux bien exprimées dans des cellules HEK293, et que l'activité des récepteurs était conservée. J'ai montré qu'APEX2 pouvait biotinyler les protéines à proximité des deux récepteurs, et ce, de façon spécifique à la présence de biotine-phénol et de peroxyde d'hydrogène. J'ai ensuite utilisé APEX2 afin de biotinyler, puis identifier par spectrométrie de masse une liste de protéines impliquées dans le trafic intracellulaire des récepteurs mu et delta opioïdes. De cette liste, j'ai choisi COPI, un complexe protéique sur lequel un ancien étudiant du laboratoire s'est intéressé auparavant, afin de valider la technique par co-immunoprécipitation. J'ai montré que les sous-unités COP $\beta$ 1 et COP $\beta$ 2 interagissaient avec DOP tel que souligné par les résultats de spectrométrie de masse, et que la stimulation du DOP semblait diminuer l'interaction de celui-ci avec COP $\beta$ 1. Je me suis ensuite penché sur l'analyse de CNIH4, une protéine peu étudiée qui semble impliquée dans la maturation et l'exportation membranaire de plusieurs RCPGs. Enfin, j'ai confirmé l'interaction entre CNIH4 et DOP par co-immunoprécipitation. Au final, j'ai montré qu'APEX2 pouvait être utilisée afin d'identifier des partenaires protéiques des récepteurs DOP (déjà montré dans la littérature) et MOP (n'a jamais été employé à cet effet à ma connaissance. J'ai ensuite utilisé cette technique afin d'identifier CNIH4 comme ciblée d'étude intéressante afin de comprendre son effet sur la régulation de la maturation et



le transport du récepteur delta opioïde à la surface cellulaire.

Mon projet de maîtrise était un projet exploratoire, avec un grand potentiel pour le développement de nouvelles avenues de recherche dans le laboratoire. Il n'est donc pas surprenant qu'il ouvre la porte à plusieurs perspectives. Dans un premier temps, bien que nous ayons confirmé que CNIH4 interagit avec DOP, le rôle de cette interaction et son effet sur le trafic du DOP reste encore à élucider. Des études d'inhibition de CNIH4 par invalidation génétique (à l'aide de siRNA) et de surexpression (par transfection transitoire) devront être faites afin d'explorer plus en détail cette interaction potentiellement très importante. De plus, des études visant à interroger la cinétique de l'interaction entre CNIH4 et DOP devront être réalisées, par exemple en utilisant la technique de BRET. Les sondes BRET permettant d'étudier cette interaction existent déjà (Sauvageau et al., 2014), ce qui facilite grandement la faisabilité de cette expérience puisque le développement et la validation de sondes BRET pour étudier une interaction donnée peut souvent représenter un défi en soi. Le laboratoire possède déjà les constructions DOP et MOP couplées à la luciférase et/ou GFP et le laboratoire du professeur Michel Bouvier possède également certaines constructions utiles à la réalisation de ce BRET et une collaboration avec eux est déjà en cours. Ensuite, bien que nous ayons choisi de trier les protéines identifiées par spectrométrie de masse en fonction du rôle attribué par la littérature à celles-ci, et que nous ayons ensuite choisi celles impliquées dans le trafic intracellulaire, plusieurs autres protéines ayant des interactions potentiellement très importantes dans la régulation et l'activité des récepteurs mu et delta opioïde pourraient être le sujet d'études plus approfondies. Dans le même ordre d'idées, nous avons choisi CNIH4 puisque cette protéine a fait le sujet d'une étude montrant qu'elle interagit avec plusieurs autres RCPGs, dont certains de la famille « *rhodopsin-like* », et que les constructions étaient disponibles dans le laboratoire de Michel Bouvier. Bien que préliminaires, mes résultats sur l'interaction entre DOP et CNIH4 sont prometteurs et justifient une recherche plus approfondie sur le rôle de CNIH4 dans la régulation potentielle du DOP et son mécanisme d'action. De telles études sont déjà en cours, avec notamment Sarah Morissette, une future étudiante à la maîtrise dans le laboratoire.

Un des objectifs de mon projet était d'identifier les différences de partenaires protéiques par la biotinylation de proximité APEX2 lors de la co-expression des

récepteurs MOP et DOP. La prémisse de cette hypothèse vient du nombre grandissant d'évidences suggérant qu'il existe un hétérodimère MOP-DOP, ainsi que la capacité de DOP et MOP à oligomériser (Massotte, 2015; Milan-Lobo & Whistler, 2011; Rozenfeld & Devi, 2007). Cet objectif n'a malheureusement pas encore été exploré dans le cadre de mon projet. Néanmoins, les outils sont maintenant tous disponibles dans le laboratoire et donc la caractérisation des changements dans les interactions protéiques lors de la co-expression du MOP et du DOP pourra être réalisée. Pour ce faire, il suffira de co-transfecter FMA avec Flag-DOP ou FDA avec Flag-MOP, puis de stimuler l'un ou l'autre des deux récepteurs avant d'activer APEX2 par l'ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pour établir l'interactome protéique déclenché par un ligand de MOP ou DOP, nous appliquerons ensuite une stratégie protéomique quantitative utilisant la méthode SILAC. Cette technique permet de mesurer les interactions dynamiques entre différentes conditions et la comparaison avec des témoins négatifs pour discriminer les contaminants. L'avantage majeur de cette méthode est que les différents échantillons avant et après activation sont mélangés avant la lyse cellulaire et la purification, prévenant ainsi les erreurs résultant de la procédure expérimentale. Cette caractérisation pourrait être très intéressante puisqu'il est bien connu dans la littérature que le MOP et le DOP peuvent entraîner des effets l'un sur l'autre, notamment lors de la stimulation de ceux-ci. De plus, certaines études ont montré que l'hétérodimère MOP-DOP était une entité à part entière, avec sa propre régulation et signalisation, faisant de ce complexe une cible particulièrement intéressante à étudier.

De façon intéressante, un très grand nombre de protéines identifiées sont impliquées dans la machinerie d'ubiquitination. Un des grands problèmes du DOP est que, contrairement au mu, une grande proportion de ceux-ci est redirigée vers la voie de dégradation intracellulaire et non pas vers les voies de recyclage (Cahill et al., 2016). Sachant cela, les partenaires protéiques impliquées dans le triage intracellulaire, la dégradation et le recyclage d'autres RCPGs qui ont été identifiés pourraient eux aussi faire le sujet d'études subséquentes, particulièrement lorsqu'ils sont seulement détectés lorsque DOP est transfecté, et non lorsque MOP l'est. Par exemple *RING-Box Protein 1* (RBX1) a été seulement détecté dans l'échantillon DOP, avec un ratio d'augmentation de plus de 20x suite à la stimulation pendant 30 minutes. De plus, plusieurs études ont lié l'interaction de certaines protéines avec RBX1 à leur ubiquitination et éventuelle dégradation (Lv et al.,

2020; Xie et al., 2020). Comme mentionné dans la discussion, les résultats de spectrométrie de masse abordés dans mon mémoire sont issus d'une seule expérience. Il sera alors très important de répéter l'expérience au moins deux autres fois afin de pouvoir en tirer une analyse statistique.

En perspective, APEX2 possède un très grand potentiel de marquage moléculaire. Cette caractéristique est précisément ce qui rend la technique d'étiquetage par APEX2 si intéressante pour capturer les protéomes d'organites, ou l'interactome de différentes protéines. Par contre, ce grand potentiel présente également le défi de rendre très difficile la résolution spatiale des protéines identifiées. En effet, comme illustre le schéma 2 de mon mémoire, la biotinylation APEX2 crée énormément de bruit de fond. Pour contrer cela, une approche particulièrement intéressante est l'utilisation de contrôles spatiaux permettant la comparaison des protéomes identifiées avec ceux des contrôles. Cette approche a d'ailleurs déjà été utilisée avec succès afin de déconvoluer les résultats de spectrométrie de masse, notamment par le groupe de Von Zastrow et Krogan (Lobingier et al., 2017). Il serait très intéressant d'utiliser certains de ces contrôles afin de permettre de diminuer le bruit de fond des analyses de spectrométrie de masse. L'utilisation de contrôles spatiaux ouvrirait la porte vers une analyse différentielle des différents partenaires d'interactions de MOP et DOP lors de leur adressage dans différents compartiments intracellulaires. Ce type d'approche permettrait de mieux cerner à quel endroit une interaction donnée se produit, une caractéristique importante lors de l'interrogation du parcours et de la signalisation de MOP et DOP.

Finalement, mes travaux de maîtrise auront pavé la voie pour l'exploration du rôle de la protéine CNIH4 dans la régulation de l'exportation du récepteur delta opioïde, en plus de fournir au laboratoire un outil puissant de détection et identification protéique, un outil particulièrement efficace lorsqu'il est couplé aux autres méthodes d'identification protéique déjà présentes dans le laboratoire, comme les modèles *in vivo* et les immunoprécipitations. Il est important de se rappeler du contexte dans lequel s'inscrit mon projet de maîtrise et la recherche du laboratoire en général. Il existe un réel problème sociétal à l'heure actuelle sur la prise d'opioïdes, un problème sans solution évidente puisque les opioïdes restent à ce jour les analgésiques les plus efficaces contre les douleurs modérées à sévères. Une des seules solutions raisonnables à ce problème est de continuer la recherche visant le développement

de nouvelles molécules analgésiques avec des profils d'effets secondaires plus avantageux. Ultimement, notre compréhension grandissante des récepteurs aux opioïdes est une victoire en soi pour la science et un grand pas dans la bonne direction pour la santé de l'Homme.

## 6 Annexes

Anticorps	Compagnie	Catalogue #	Mono/Poly	Espèce	Dilution
HA-HRP(3F10)	Roche	12013819001	Mono	Rat	1/3000
HA mono	Covance	MMS-101P	Mono		1/1000-3000
Myc-HRP	Abcam	Ab1261			1/6000
FlagM2	Sigma-Aldrich	F1804	Mono	Lapin	1/300
Flag poly	Invitrogen	Pa1-984B	Poly	Lapin	1/1000-2000
Flag poly	Sigma-Aldrich	F7425	Poly	Lapin	1/1000-2000
Rabbit-HRP	GE Healthcare	NA931V		Lapin	1/5000-10000
p-p42/44	Cell Signalling Technology	9101	Poly	Lapin	1/1000
p42/44	Cell Signalling Technology	9102	Poly	Lapin	1/1000
Streptavidin-HRP	Thermo Scientific	21130			1/1000

**Tableau 4 : Liste d'anticorps utilisés au cours de ma maîtrise.** Tableau résumant les anticorps utilisés durant ma maîtrise lors des essais d'immunobuvardage, d'immunoprécipitation, de biotinylation et de cinétique d'activation des MAPK. Les anticorps fonctionnent tous dans une solution de TBS-T 0.1% avec du lait 5% ou une solution de TBS-T 0,1% BSA 3%.

## 7 Bibliographie

- A Basic Review of Pain Pathways and Analgesia*. (2019, February 11). Anesthesia Experts. <https://anesthesiaexperts.com/uncategorized/basic-review-pain-pathways-analgesia/>
- Al-Hasani, R., & Bruchas, M. R. (2011). Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-dependent Signaling and Behavior. *Anesthesiology*, 115(6), 1363–1381. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e318238bba6>
- Animals, N. R. C. (US) C. on R. and A. of P. in L. (2009). Mechanisms of Pain. In *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals*. National Academies Press (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK32659/>
- APEX2-mediated RAB proximity labeling identifies a role for RAB21 in clathrin-independent cargo sorting. (2019). *EMBO Reports*, 20(2), e47192. <https://doi.org/10.15252/embr.201847192>
- Arttamangkul, S., Leff, E. R., Koita, O., Birdsong, W. T., & Williams, J. T. (2019). Separation of Acute Desensitization and Long-Term Tolerance of  $\mu$ -Opioid Receptors Is Determined by the Degree of C-Terminal Phosphorylation. *Molecular Pharmacology*, 96(4), 505–514. <https://doi.org/10.1124/mol.119.117358>
- Awoniyi, L. O., Runsala, M., Šustar, V., Hernández-Pérez, S., Sarapulov, A. V., Petrov, P., & Mattila, P. K. (2021). Novel players and large-scale protein dynamics of BCR activation revealed by APEX2 proximity labelling of lipid rafts. *BioRxiv*, 2020.09.29.318766. <https://doi.org/10.1101/2020.09.29.318766>

Bardoni, R., Tawfik, V. L., Wang, D., François, A., Solorzano, C., Shuster, S. A., Choudhury, P., Betelli, C., Cassidy, C., Smith, K., de Nooij, J. C., Mennicken, F., O'Donnell, D., Kieffer, B. L., Woodbury, C. J., Basbaum, A. I., MacDermott, A. B., & Scherrer, G. (2014). Delta Opioid Receptors Presynaptically Regulate Cutaneous Mechanosensory Neuron Input to the Spinal Cord Dorsal Horn. *Neuron*, *81*(6), 1312–1327. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.044>

Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*, *139*(2), 267–284. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>

Beaudry, H., Mercier-Blais, A.-A., Delaygue, C., Lavoie, C., Parent, J.-L., Neugebauer, W., & Gendron, L. (2015). Regulation of  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptor functions: Involvement of cyclin-dependent kinase 5. *British Journal of Pharmacology*, *172*(10), 2573–2587. <https://doi.org/10.1111/bph.13088>

Berman, D. E., Dall'Armi, C., Voronov, S. V., McIntire, L. B. J., Zhang, H., Moore, A. Z., Staniszewski, A., Arancio, O., Kim, T.-W., & Di Paolo, G. (2008). Oligomeric amyloid- $\beta$  peptide disrupts phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate metabolism. *Nature Neuroscience*, *11*(5), 547–554. <https://doi.org/10.1038/nn.2100>

Bersuker, K., & Olzmann, J. A. (2019). Identification of Lipid Droplet Proteomes by Proximity Labeling Proteomics Using APEX2. In M. Sunbul & A. Jäschke (Eds.), *Proximity Labeling: Methods and Protocols* (pp. 57–72). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9537-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9537-0_5)

Béthune, J., Wieland, F., & Moelleken, J. (2006). COPI-mediated Transport. *The Journal of Membrane Biology*, *211*(2), 65–79. <https://doi.org/10.1007/s00232-006-0859-7>

Blakemore, P. R., & White, J. D. (2002). Morphine, the Proteus of organic molecules. *Chemical Communications*, 11, 1159–1168. <https://doi.org/10.1039/B111551K>

Bökel, C., Dass, S., Wilsch-Bräuninger, M., & Roth, S. (2006). Drosophila Cornichon acts as cargo receptor for ER export of the TGF $\alpha$ -like growth factor Gurken. *Development*, 133(3), 459–470. <https://doi.org/10.1242/dev.02219>

Bond, C., LaForge, K. S., Tian, M., Melia, D., Zhang, S., Borg, L., Gong, J., Schluger, J., Strong, J. A., Leal, S. M., Tischfield, J. A., Kreek, M. J., & Yu, L. (1998). Single-nucleotide polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters  $\beta$ -endorphin binding and activity: Possible implications for opiate addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(16), 9608–9613. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.16.9608>

Bouvier, M. (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(4), 274–286. <https://doi.org/10.1038/35067575>

Branon, T. C., Bosch, J. A., Sanchez, A. D., Udeshi, N. D., Svinkina, T., Carr, S. A., Feldman, J. L., Perrimon, N., & Ting, A. Y. (2018). Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nature Biotechnology*, 36(9), 880–887. <https://doi.org/10.1038/nbt.4201>

Bruce, N. J., Narzi, D., Trpevski, D., Keulen, S. C. van, Nair, A. G., Röthlisberger, U., Wade, R. C., Carloni, P., & Kotaleski, J. H. (2019). Regulation of adenylyl cyclase 5 in striatal neurons confers the ability to detect coincident neuromodulatory signals. *PLOS Computational Biology*, 15(10), e1007382. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007382>



Brunet, M. A., Leblanc, S., & Roucou, X. (2020). Reconsidering proteomic diversity with functional investigation of small ORFs and alternative ORFs. *Experimental Cell Research*, 393(1), 112057. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112057>

Cahill, C. M., McClellan, K. A., Morinville, A., Hoffert, C., Hubatsch, D., O'Donnell, D., & Beaudet, A. (2001). Immunohistochemical distribution of delta opioid receptors in the rat central nervous system: Evidence for somatodendritic labeling and antigen-specific cellular compartmentalization. *Journal of Comparative Neurology*, 440(1), 65–84. <https://doi.org/10.1002/cne.1370>

Cahill, C. M., Morinville, A., Lee, M.-C., Vincent, J.-P., Collier, B., & Beaudet, A. (2001). Prolonged Morphine Treatment Targets  $\delta$  Opioid Receptors to Neuronal Plasma Membranes and Enhances  $\delta$ -Mediated Antinociception. *Journal of Neuroscience*, 21(19), 7598–7607. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-19-07598.2001>

Cahill, C. M., Walwyn, W., Taylor, A. M. W., Pradhan, A. A. A., & Evans, C. J. (2016). Allostatic Mechanisms of Opioid Tolerance Beyond Desensitization and Downregulation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(11), 963–976. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.08.002>

Canada, H. (2019, August 8). *Canadian Pain Task Force Report: June 2019* [Transparency - other]. <https://www.canada.ca/en/health-canada/corporate/about-health-canada/public-engagement/external-advisory-bodies/canadian-pain-task-force/report-2019.html>

Carlo, M., Stefano, P., & Francesca, M. (2018). Nociceptin /Orphanin FQ Peptide (NOP) Receptor Modulators: An Update in Structure-Activity Relationships. *Current Medicinal Chemistry*, 25(20), 2353–2384.

Castro, C. P., Piscopo, D., Nakagawa, T., & Derynck, R. (2007). Cornichon regulates transport and secretion of TGF $\alpha$ -related proteins in metazoan cells. *Journal of Cell Science*, 120(14), 2454–2466. <https://doi.org/10.1242/jcs.004200>

Catterall, W. A. (2011). Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(8), a003947. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947>

Charbogne, P., Kieffer, B. L., & Befort, K. (2014). 15 years of genetic approaches in vivo for addiction research: Opioid receptor and peptide gene knockout in mouse models of drug abuse. *Neuropharmacology*, 76, 204–217. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.08.028>

Charfi, I., Abdallah, K., Gendron, L., & Pineyro, G. (2018). Delta opioid receptors recycle to the membrane after sorting to the degradation path. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(12), 2257–2271. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2732-5>

Chaturvedi, K., Bandari, P., Chinen, N., & Howells, R. D. (2001). Proteasome Involvement in Agonist-induced Down-regulation of  $\mu$  and  $\delta$  Opioid Receptors \*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(15), 12345–12355. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008054200>

Chen, L., & Michalsen, A. (2017). Management of chronic pain using complementary and integrative medicine. *BMJ*, 357, j1284. <https://doi.org/10.1136/bmj.j1284>

Chen, L.-W., Gao, C., Zhou, D.-H., Wei, Q., Xu, X.-J., Chen, J., & Chi, Z.-Q. (2002). Homodimerization of Human Mu-Opioid Receptor Overexpressed in Sf9 Insect Cells. *Protein & Peptide Letters*, 9(2), 145–152.

- Cheng, X.-T., Xie, Y.-X., Zhou, B., Huang, N., Farfel-Becker, T., & Sheng, Z.-H. (2018). Revisiting LAMP1 as a marker for degradative autophagy-lysosomal organelles in the nervous system. *Autophagy*, *14*(8), 1472–1474. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1482147>
- Chu Sin Chung, P., & Kieffer, B. L. (2013). Delta opioid receptors in brain function and diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, *140*(1), 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.06.003>
- Cooper, D. M. F., Mons, N., & Karpen, J. W. (1995). Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature*, *374*(6521), 421–424. <https://doi.org/10.1038/374421a0>
- Costa, T., & Herz, A. (1989). Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(19), 7321–7325.
- Cox, J., & Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*, *26*(12), 1367–1372. <https://doi.org/10.1038/nbt.1511>
- Crain, S. M., & Shen, K. F. (1990). Opioids can evoke direct receptor-mediated excitatory effects on sensory neurons. *Trends in Pharmacological Sciences*, *11*(2), 77–81. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(90\)90322-y](https://doi.org/10.1016/0165-6147(90)90322-y)
- Cruccu, G., Garcia-Larrea, L., Hansson, P., Keindl, M., Lefaucheur, J.-P., Paulus, W., Taylor, R., Tronnier, V., Truini, A., & Attal, N. (2016). EAN guidelines on central neurostimulation therapy in chronic pain conditions. *European Journal of Neurology*, *23*(10), 1489–1499. <https://doi.org/10.1111/ene.13103>

Cruz, H. G., Ivanova, T., Lunn, M.-L., Stoffel, M., Slesinger, P. A., & Lüscher, C. (2004). Bi-directional effects of GABA B receptor agonists on the mesolimbic dopamine system. *Nature Neuroscience*, 7(2), 153–159. <https://doi.org/10.1038/nn1181>

Dahlhamer, J. (2018). Prevalence of Chronic Pain and High-Impact Chronic Pain Among Adults—United States, 2016. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 67. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6736a2>

Daniels, D. J., Lenard, N. R., Etienne, C. L., Law, P.-Y., Roerig, S. C., & Portoghese, P. S. (2005). Opioid-induced tolerance and dependence in mice is modulated by the distance between pharmacophores in a bivalent ligand series. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 19208–19213. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506627102>

Dascal, N. (1997a). Signalling Via the G Protein-Activated K<sup>+</sup> Channels. *Cellular Signalling*, 9(8), 551–573. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(97\)00095-8](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(97)00095-8)

Dascal, N. (1997b). Signalling Via the G Protein-Activated K<sup>+</sup> Channels. *Cellular Signalling*, 9(8), 551–573. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(97\)00095-8](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(97)00095-8)

Décaillot, F. M., Rozenfeld, R., Gupta, A., & Devi, L. A. (2008). Cell surface targeting of  $\mu$ - $\delta$  opioid receptor heterodimers by RTP4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(41), 16045–16050. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804106105>

Degrandmaison, J., Abdallah, K., Blais, V., Génier, S., Lalumière, M.-P., Bergeron, F., Cahill, C. M., Boulter, J., Lavoie, C. L., Parent, J.-L., & Gendron, L. (2020). In vivo mapping of a GPCR interactome using knockin mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(23), 13105–13116. <https://doi.org/10.1073/pnas.1917906117>

Derouiche, L., Ugur, M., Pierre, F., Mann, A., Doridot, S., Ory, S., Schulz, S., & Massotte, D. (2018). *Heteromerization of endogenous mu and delta opioid receptors tunes mu opioid receptor signaling and trafficking* [Preprint]. Neuroscience. <https://doi.org/10.1101/455147>

Devi, L. (2000). Dimerization of G-Protein Coupled Receptors. *Neuropsychopharmacology*, 23(4), S3–S4. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00154-8](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00154-8)

Devi, L. A., & Brady, L. S. (2000). Dimerization of G-Protein Coupled Receptors. *Neuropsychopharmacology*, 23(4, Supplement 1), S3–S4. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00154-8](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00154-8)

Dinakar, P., & Stillman, A. M. (2016). Pathogenesis of Pain. *Seminars in Pediatric Neurology*, 23(3), 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2016.10.003>

Ding, H., Kiguchi, N., Yasuda, D., Daga, P. R., Polgar, W. E., Lu, J. J., Czoty, P. W., Kishioka, S., Zaveri, N. T., & Ko, M.-C. (2018). A bifunctional nociceptin and mu opioid receptor agonist is analgesic without opioid side effects in nonhuman primates. *Science Translational Medicine*, 10(456). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aar3483>

Dolphin, A. C. (1998). Mechanisms of modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *The Journal of Physiology*, 506(1), 3–11. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.003bx.x>

Donnelly, D., Maudsley, S., Gent, J. P., Moser, R. N., Hurrell, C. R., & Findlay, J. B. C. (1999). Conserved polar residues in the transmembrane domain of the human tachykinin NK2 receptor: Functional roles and structural implications. *Biochemical Journal*, 339(1), 55–61. <https://doi.org/10.1042/bj3390055>

Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: The sensors of the pain pathway. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3760–3772. <https://doi.org/10.1172/JCI42843>

Dubois, M.-L., Bastin, C., Lévesque, D., & Boisvert, F.-M. (2016). Comprehensive Characterization of Minichromosome Maintenance Complex (MCM) Protein Interactions Using Affinity and Proximity Purifications Coupled to Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 15(9), 2924–2934. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b01081>

Dumont, A.-A., Dumont, L., Berthiaume, J., & Auger-Messier, M. (2019). P38 $\alpha$  MAPK proximity assay reveals a regulatory mechanism of alternative splicing in cardiomyocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1866(12), 118557. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.118557>

Dwyer, D. J., Belenky, P. A., Yang, J. H., MacDonald, I. C., Martell, J. D., Takahashi, N., Chan, C. T. Y., Lobritz, M. A., Braff, D., Schwarz, E. G., Ye, J. D., Pati, M., Vercruysse, M., Ralifo, P. S., Allison, K. R., Khalil, A. S., Ting, A. Y., Walker, G. C., & Collins, J. J. (2014). Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(20), E2100–E2109. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401876111>

Fernández-Alacid, L., Aguado, C., Ciruela, F., Martín, R., Colón, J., Cabañero, M. J., Gassmann, M., Watanabe, M., Shigemoto, R., Wickman, K., Bettler, B., Sánchez-Prieto, J., & Luján, R. (2009). Subcellular compartment-specific molecular diversity of pre- and post-synaptic GABAB-activated GIRK channels in Purkinje cells. *Journal of Neurochemistry*, 110(4), 1363–1376. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06229.x>

Finnerup, N. B. (2019). Nonnarcotic Methods of Pain Management. *New England Journal of Medicine*, 380(25), 2440–2448. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1807061>

Fischer, B., Pang, M., & Jones, W. (2020). The opioid mortality epidemic in North America: Do we understand the supply side dynamics of this unprecedented crisis? *Substance Abuse Treatment, Prevention, and Policy*, 15(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s13011-020-0256-8>

Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L.-G., & Schiöth, H. B. (2003). The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Molecular Pharmacology*, 63(6), 1256–1272. <https://doi.org/10.1124/mol.63.6.1256>

Fu, L., Qin, Y.-R., Xie, D., Hu, L., Kwong, D. L., Srivastava, G., Tsao, S. W., & Guan, X.-Y. (2007). Characterization of a Novel Tumor-Suppressor Gene *PLCδ1* at 3p22 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research*, 67(22), 10720–10726. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2411>

Fukami, K., Inanobe, S., Kanemaru, K., & Nakamura, Y. (2010). Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance. *Progress in Lipid Research*, 49(4), 429–437. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.06.001>

Gao, X., Zhang, H., You, Z., Lu, C., & He, C. (2007). G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in dorsal root ganglion neurons. *Acta Pharmacologica Sinica*, 28(2), 185–190. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2007.00478.x>

Garzón, J., Castro, M., & Sánchez-Blázquez, P. (1998). Influence of Gz and Gi2 transducer proteins in the affinity of opioid agonists to  $\mu$  receptors: Coupling of  $\mu$  receptors to Gz and Gi2 proteins. *European Journal of Neuroscience*, 10(8), 2557–2564. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00267.x>

Gavériaux-Ruff, C., & Kieffer, B. L. (2011). Delta opioid receptor analgesia: Recent contributions from pharmacology and molecular approaches. *Behavioural Pharmacology*, 22(5 and 6), 405–414. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e32834a1f2c>

Ge, X., Loh, H. H., & Law, P.-Y. (2009).  $\mu$ -Opioid Receptor Cell Surface Expression Is Regulated by Its Direct Interaction with Ribophorin I. *Molecular Pharmacology*, 75(6), 1307–1316. <https://doi.org/10.1124/mol.108.054064>

Gendron, L., Cahill, C. M., Zastrow, M. von, Schiller, P. W., & Pineyro, G. (2016). Molecular Pharmacology of  $\delta$ -Opioid Receptors. *Pharmacological Reviews*, 68(3), 631–700. <https://doi.org/10.1124/pr.114.008979>

Gendron, L., Lucido, A. L., Mennicken, F., O'Donnell, D., Vincent, J.-P., Stroh, T., & Beaudet, A. (2006). Morphine and Pain-Related Stimuli Enhance Cell Surface Availability of Somatic  $\delta$ -Opioid Receptors in Rat Dorsal Root Ganglia. *Journal of Neuroscience*, 26(3), 953–962. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3598-05.2006>



Gendron, L., Mittal, N., Beaudry, H., & Walwyn, W. (2015). Recent advances on the  $\delta$  opioid receptor: From trafficking to function. *British Journal of Pharmacology*, 172(2), 403–419. <https://doi.org/10.1111/bph.12706>

Génier, S., Degrandmaison, J., Moreau, P., Labrecque, P., Hébert, T. E., & Parent, J.-L. (2016). Regulation of GPCR expression through an interaction with CCT7, a subunit of the CCT/TRiC complex. *Molecular Biology of the Cell*, 27(24), 3800–3812. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-04-0224>

George, S. R., Fan, T., Xie, Z., Tse, R., Tam, V., Varghese, G., & O'Dowd, B. F. (2000). Oligomerization of  $\mu$ - and  $\delta$ -Opioid Receptors: GENERATION OF NOVEL FUNCTIONAL PROPERTIES \*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(34), 26128–26135. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000345200>

Gether, U. (2000). Uncovering Molecular Mechanisms Involved in Activation of G Protein-Coupled Receptors. *Endocrine Reviews*, 21(1), 90–113. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.1.0390>

Goldsmith, Z. G., & Dhanasekaran, D. N. (2007). G Protein regulation of MAPK networks. *Oncogene*, 26(22), 3122–3142. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210407>

Gomes, I., Fujita, W., Gupta, A., Saldanha, S. A., Negri, A., Pinello, C. E., Eberhart, C., Roberts, E., Filizola, M., Hodder, P., & Devi, L. A. (2013a). Identification of a  $\mu$ - $\delta$  opioid receptor heteromer-biased agonist with antinociceptive activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(29), 12072–12077. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222044110>

Gomes, I., Fujita, W., Gupta, A., Saldanha, S. A., Negri, A., Pinello, C. E., Eberhart, C., Roberts, E., Filizola, M., Hodder, P., & Devi, L. A. (2013b). Identification of a  $\mu$ - $\delta$  opioid receptor heteromer-biased agonist with antinociceptive activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(29), 12072–12077. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222044110>

Gomes, I., Gupta, A., Filipovska, J., Szeto, H. H., Pintar, J. E., & Devi, L. A. (2004). A role for heterodimerization of  $\mu$  and  $\delta$  opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(14), 5135–5139. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307601101>

Gomes, I., Jordan, B. A., Gupta, A., Trapaizze, N., Nagy, V., & Devi, L. A. (2000). Heterodimerization of  $\mu$  and  $\delta$  Opioid Receptors: A Role in Opiate Synergy. *Journal of Neuroscience*, *20*(22), RC110–RC110. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-22-j0007.2000>

Gordon, D. B., Dahl, J. L., Miaskowski, C., McCarberg, B., Todd, K. H., Paice, J. A., Lipman, A. G., Bookbinder, M., Sanders, S. H., Turk, D. C., & Carr, D. B. (2005). American Pain Society Recommendations for Improving the Quality of Acute and Cancer Pain Management: American Pain Society Quality of Care Task Force. *Archives of Internal Medicine*, *165*(14), 1574. <https://doi.org/10.1001/archinte.165.14.1574>

GPCR | Learn Science at Scitable. (n.d.). Retrieved July 11, 2021, from <https://www.nature.com/scitable/topicpage/gpcr-14047471/>

Groer, C. E., Schmid, C. L., Jaeger, A. M., & Bohn, L. M. (2011). Agonist-directed Interactions with Specific  $\beta$ -Arrestins Determine  $\mu$ -Opioid Receptor Trafficking, Ubiquitination, and Dephosphorylation \*. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(36), 31731–31741. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.248310>

Gupta, A., Mulder, J., Gomes, I., Rozenfeld, R., Bushlin, I., Ong, E., Lim, M., Maillet, E., Junek, M., Cahill, C. M., Harkany, T., & Devi, L. A. (2010). Increased Abundance of Opioid Receptor Heteromers After Chronic Morphine Administration. *Science Signaling*, 3(131), ra54–ra54. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000807>

Halls, M. L., & Cooper, D. M. F. (2017). Adenylyl cyclase signalling complexes – Pharmacological challenges and opportunities. *Pharmacology & Therapeutics*, 172, 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.01.001>

Han, S., Udeshi, N. D., Deerinck, T. J., Svinkina, T., Ellisman, M. H., Carr, S. A., & Ting, A. Y. (2017). Proximity Biotinylation as a Method for Mapping Proteins Associated with mtDNA in Living Cells. *Cell Chemical Biology*, 24(3), 404–414. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.02.002>

Han, Y., Branon, T. C., Martell, J. D., Boassa, D., Shechner, D., Ellisman, M. H., & Ting, A. (2019). Directed Evolution of Split APEX2 Peroxidase. *ACS Chemical Biology*, 14(4), 619–635. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00919>

Harvey, J. H., Long, D. H., England, P. M., & Whistler, J. L. (2012). Tuned-Affinity Bivalent Ligands for the Characterization of Opioid Receptor Heteromers. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 3(8), 640–644. <https://doi.org/10.1021/ml300083p>

Hasbi, A., Nguyen, T., Fan, T., Cheng, R., Rashid, A., Alijaniam, M., Rasenick, M. M., O'Dowd, B. F., & George, S. R. (2007). Trafficking of Preassembled Opioid  $\mu$ - $\delta$  Heterooligomer-Gz Signaling Complexes to the Plasma Membrane: Coregulation by Agonists. *Biochemistry*, 46(45), 12997–13009. <https://doi.org/10.1021/bi701436w>

He, S.-Q., Zhang, Z.-N., Guan, J.-S., Liu, H.-R., Zhao, B., Wang, H.-B., Li, Q., Yang, H., Luo, J., Li, Z.-Y., Wang, Q., Lu, Y.-J., Bao, L., & Zhang, X. (2011). Facilitation of  $\mu$ -Opioid Receptor Activity by Preventing  $\delta$ -Opioid Receptor-Mediated Codegradation. *Neuron*, 69(1), 120–131. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.12.001>

*Heteromerization of endogenous mu and delta opioid receptors tunes mu opioid receptor signaling and trafficking* | *bioRxiv*. (n.d.). Retrieved July 11, 2021, from <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/455147v1>

Hislop, J. N., Henry, A. G., & Zastrow, M. von. (2011). Ubiquitination in the First Cytoplasmic Loop of  $\mu$ -Opioid Receptors Reveals a Hierarchical Mechanism of Lysosomal Down-regulation \*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(46), 40193–40204. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.288555>

Hogan, M.-E., Taddio, A., Katz, J., Shah, V., & Krahn, M. (2016). Incremental health care costs for chronic pain in Ontario, Canada: A population-based matched cohort study of adolescents and adults using administrative data. *Pain*, 157(8), 1626–1633. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000561>

Hosohata, K., Burkey, T. H., Alfaro-Lopez, J., Hruby, V. J., Roeske, W. R., & I. Yamamura, H. (1999). (2S,3R) TMT-1-Tic-OH is a potent inverse agonist at the human  $\delta$ -opioid receptor. *European Journal of Pharmacology*, 380(1), R9–R10. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00516-6](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00516-6)

Huang, P., Chen, C., Mague, S. D., Blendy, J. A., & Liu-Chen, L.-Y. (2012). A common single nucleotide polymorphism A118G of the  $\mu$  opioid receptor alters its N-glycosylation and protein stability. *Biochemical Journal*, 441(1), 379–386. <https://doi.org/10.1042/BJ20111050>

Hung, V., Udeshi, N. D., Lam, S. S., Loh, K. H., Cox, K. J., Pedram, K., Carr, S. A., & Ting, A. Y. (2016). Spatially resolved proteomic mapping in living cells with the engineered peroxidase APEX2. *Nature Protocols*, 11(3), 456–475. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.018>

Iqbal, H., Akins, D. R., & Kenedy, M. R. (2018). Co-immunoprecipitation for Identifying Protein-Protein Interactions in *Borrelia burgdorferi*. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1690, 47–55. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7383-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7383-5_4)

Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (1997). Voltage-gated and inwardly rectifying potassium channels. *The Journal of Physiology*, 505(2), 267–282. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1997.267bb.x>

Jennifer, T. L., & John, R. T. (2013). Opioid Receptor Interacting Proteins and the Control of Opioid Signaling. *Current Pharmaceutical Design*, 19(42), 7333–7347.

Jia, S., Peng, J., Gao, B., Chen, Z., Zhou, Y., Fu, Q., Wang, H., & Zhan, L. (2011). Relative Quantification of Protein-Protein Interactions Using a Dual Luciferase Reporter Pull-Down Assay System. *PLOS ONE*, 6(10), e26414. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026414>

Jordan, B. A., & Devi, L. A. (1999). G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature*, 399(6737), 697–700. <https://doi.org/10.1038/21441>

Julius, D., & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852), 203–210. <https://doi.org/10.1038/35093019>

- Jung, J.-G., Stoeck, A., Guan, B., Wu, R.-C., Zhu, H., Blackshaw, S., Shih, I.-M., & Wang, T.-L. (2014). Notch3 Interactome Analysis Identified WWP2 as a Negative Regulator of Notch3 Signaling in Ovarian Cancer. *PLoS Genetics*, 10(10), e1004751. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004751>
- Kaewsapsak, P., Shechner, D. M., Mallard, W., Rinn, J. L., & Ting, A. Y. (n.d.). Live-cell mapping of organelle-associated RNAs via proximity biotinylation combined with protein-RNA crosslinking. *ELife*, 6, e29224. <https://doi.org/10.7554/eLife.29224>
- Kasai, S., Yamamoto, H., Kamegaya, E., Uhl, G. R., Sora, I., Watanabe, M., & Ikeda, K. (2011). Quantitative Detection of  $\mu$  Opioid Receptor: Western Blot Analyses Using  $\mu$  Opioid Receptor Knockout Mice. *Current Neuropharmacology*, 9(1), 219–222. <https://doi.org/10.2174/157015911795016921>
- Kieffer, B. L., & Gavériaux-Ruff, C. (2002). Exploring the opioid system by gene knockout. *Progress in Neurobiology*, 66(5), 285–306. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00008-4](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00008-4)
- Kivell, B. M., Day, D. J., McDonald, F. J., & Miller, J. H. (2004). Mu and delta opioid receptor immunoreactivity and mu receptor regulation in brainstem cells cultured from late fetal and early postnatal rats. *Developmental Brain Research*, 149(1), 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2003.11.012>
- Kouhen, R. E., Burd, A. L., Erickson-Herbrandson, L. J., Chang, C.-Y., Law, P.-Y., & Loh, H. H. (2001). Phosphorylation of Ser363, Thr370, and Ser375 Residues within the Carboxyl Tail Differentially Regulates  $\mu$ -Opioid Receptor Internalization \*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 12774–12780. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009571200>
- Krausz, M. R., & Jang, K. L. (2018). North American opioid crisis: Decline and fall of the war on drugs. *The Lancet Psychiatry*, 5(1), 6–8. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(17\)30479-0](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(17)30479-0)

Lam, S. S., Martell, J. D., Kamer, K. J., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Mootha, V. K., & Ting, A. Y. (2015a). Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proteomics. *Nature Methods*, *12*(1), 51–54. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3179>

Lam, S. S., Martell, J. D., Kamer, K. J., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Mootha, V. K., & Ting, A. Y. (2015b). Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. *Nature Methods*, *12*(1), 51–54. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3179>

Law, P. Y., Hom, D. S., & Loh, H. H. (1983). Opiate regulation of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate level in neuroblastoma X glioma NG108-15 hybrid cells. Relationship between receptor occupancy and effect. *Molecular Pharmacology*, *23*(1), 26–35.

Law, P. Y., & Loh, H. H. (1999). Regulation of opioid receptor activities. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *289*(2), 607–624.

Leskelä, T. (n.d.). *Human  $\delta$  opioid receptor Phe27 and Cys27 variants: The role of heteromerization and pharmacological chaperones in receptor processing and trafficking*. 138.

Lobingier, B. T., Hüttenhain, R., Eichel, K., Miller, K. B., Ting, A. Y., Zastrow, M. von, & Krogan, N. J. (2017). An Approach to Spatiotemporally Resolve Protein Interaction Networks in Living Cells. *Cell*, *169*(2), 350–360.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.022>

Loh, K. H., Stawski, P. S., Draycott, A. S., Udeshi, N. D., Lehrman, E. K., Wilton, D. K., Svinkina, T., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Stevens, B., Carr, S. A., & Ting, A. Y. (2016). Proteomic Analysis of Unbounded Cellular Compartments: Synaptic Clefts. *Cell*, 166(5), 1295-1307.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.041>

Louche, A., Salcedo, S. P., & Bigot, S. (2017). Protein–Protein Interactions: Pull-Down Assays. In L. Journet & E. Cascales (Eds.), *Bacterial Protein Secretion Systems: Methods and Protocols* (pp. 247–255). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7033-9\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7033-9_20)

Lucido, A. L., Morinville, A., Gendron, L., Stroh, T., & Beaudet, A. (2005). Prolonged morphine treatment selectively increases membrane recruitment of  $\delta$ -opioid receptors in mouse basal ganglia. *Journal of Molecular Neuroscience*, 25(3), 207–214. <https://doi.org/10.1385/JMN:25:3:207>

Lv, L., Chen, P., Cao, L., Li, Y., Zeng, Z., Cui, Y., Wu, Q., Li, J., Wang, J.-H., Dong, M.-Q., Qi, X., & Han, T. (2020). Discovery of a molecular glue promoting CDK12-DDB1 interaction to trigger cyclin K degradation. *ELife*, 9, e59994. <https://doi.org/10.7554/eLife.59994>

Manglik, A., Kruse, A. C., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Mathiesen, J. M., Sunahara, R. K., Pardo, L., Weis, W. I., Kobilka, B. K., & Granier, S. (2012). Crystal structure of the  $\mu$ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*, 485(7398), 321–326. <https://doi.org/10.1038/nature10954>

Markkanen, P. M. H., & Petäjä-Repo, U. E. (2008). N-Glycan-mediated Quality Control in the Endoplasmic Reticulum Is Required for the Expression of Correctly Folded  $\delta$ -Opioid Receptors at the Cell Surface\*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(43), 29086–29098. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801880200>



Marshall, M. R., Pattu, V., Halimani, M., Maier-Peuschel, M., Müller, M.-L., Becherer, U., Hong, W., Hoth, M., Tschernig, T., Bryceson, Y. T., & Rettig, J. (2015). VAMP8-dependent fusion of recycling endosomes with the plasma membrane facilitates T lymphocyte cytotoxicity. *The Journal of Cell Biology*, 210(1), 1047–1063. <https://doi.org/10.1083/jcb.201411093>

Martell, J. D., Deerinck, T. J., Lam, S. S., Ellisman, M. H., & Ting, A. Y. (2017). Electron microscopy using the genetically encoded APEX2 tag in cultured mammalian cells. *Nature Protocols*, 12(9), 1792–1816. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.065>

Martell, J. D., Deerinck, T. J., Sancak, Y., Poulos, T. L., Mootha, V. K., Sosinsky, G. E., Ellisman, M. H., & Ting, A. Y. (2012). Engineered ascorbate peroxidase as a genetically-encoded reporter for electron microscopy. *Nature Biotechnology*, 30(11), 1143–1148. <https://doi.org/10.1038/nbt.2375>

Massotte, D. (2015). In vivo opioid receptor heteromerization: Where do we stand? *British Journal of Pharmacology*, 172(2), 420–434. <https://doi.org/10.1111/bph.12702>

May, D. G., Scott, K. L., Campos, A. R., & Roux, K. J. (2020). Comparative Application of BioID and TurboID for Protein-Proximity Biotinylation. *Cells*, 9(5), 1070. <https://doi.org/10.3390/cells9051070>

Mennicken, F., Zhang, J., Hoffert, C., Ahmad, S., Beaudet, A., & O'Donnell, D. (2003). Phylogenetic changes in the expression of delta opioid receptors in spinal cord and dorsal root ganglia. *Journal of Comparative Neurology*, 465(3), 349–360. <https://doi.org/10.1002/cne.10839>

Metcalf, M. D., Yekkirala, A. S., Powers, M. D., Kitto, K. F., Fairbanks, C. A., Wilcox, G. L., & Portoghese, P. S. (2012). The  $\delta$  Opioid Receptor Agonist SNC80 Selectively Activates Heteromeric  $\mu$ - $\delta$  Opioid Receptors. *ACS Chemical Neuroscience*, 3(7), 505–509. <https://doi.org/10.1021/cn3000394>

Milan-Lobo, L., & Whistler, J. L. (2011). Heteromerization of the  $\mu$ - and  $\delta$ -Opioid Receptors Produces Ligand-Biased Antagonism and Alters  $\mu$ -Receptor Trafficking. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 337(3), 868–875. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.179093>

Miller, G. M., Bendor, J., Tiefenbacher, S., Yang, H., Novak, M. A., & Madras, B. K. (2004). A  $\mu$ -opioid receptor single nucleotide polymorphism in rhesus monkey: Association with stress response and aggression. *Molecular Psychiatry*, 9(1), 99–108. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001378>

Mills, S. E. E., Nicolson, K. P., & Smith, B. H. (2019). Chronic pain: A review of its epidemiology and associated factors in population-based studies. *British Journal of Anaesthesia*, 123(2), e273–e283. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.03.023>

Mintseris, J., & Gygi, S. P. (2020). High-density chemical cross-linking for modeling protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(1), 93–102. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902931116>

*Molecular Pharmacology of  $\delta$ -Opioid Receptors* | *Pharmacological Reviews*. (n.d.). Retrieved July 11, 2021, from <https://pharmrev.aspetjournals.org/content/68/3/631>

Mons, N., Decorte, L., Jaffard, R., & Cooper, D. (1998).  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive adenylyl cyclases, key integrators of cellular signalling. *Life Sciences*, 62(17–18), 1647–1652. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(98\)00122-2](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(98)00122-2)

Morinville, A., Cahill, C. M., Esdaile, M. J., Aibak, H., Collier, B., Kieffer, B. L., & Beaudet, A. (n.d.). *Regulation of  $\mu$ -Opioid Receptor Trafficking via  $\mu$ -Opioid Receptor Stimulation: Evidence from  $\mu$ -Opioid Receptor Knock-Out Mice*. 11.

Murthy, K. S., & Makhlouf, G. M. (1996). Opioid mu, delta, and kappa receptor-induced activation of phospholipase C-beta 3 and inhibition of adenylyl cyclase is mediated by Gi2 and G(o) in smooth muscle. *Molecular Pharmacology*, 50(4), 870–877.

Mustazza, C., Pieretti, S., & Marzoli, F. (2018). Nociceptin /Orphanin FQ Peptide (NOP) Receptor Modulators: An Update in Structure-Activity Relationships. *Current Medicinal Chemistry*, 25(20), 2353–2384. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180111095458>

Neilan, C. L., Akil, H., Woods, J. H., & Traynor, J. R. (1999). Constitutive activity of the  $\delta$ -opioid receptor expressed in C6 glioma cells: Identification of non-peptide  $\delta$ -inverse agonists. *British Journal of Pharmacology*, 128(3), 556–562. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702816>

Nestler, E. J. (2004). Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(4), 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.02.005>

Nestler, E. J., & Aghajanian, G. K. (1997). Molecular and Cellular Basis of Addiction. *Science*, 278(5335), 58–63. <https://doi.org/10.1126/science.278.5335.58>

Ohtsubo, K., & Marth, J. D. (2006). Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell*, 126(5), 855–867. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.019>

- Ong, E. W., & Cahill, C. M. (2014). Molecular Perspectives for mu/delta Opioid Receptor Heteromers as Distinct, Functional Receptors. *Cells*, 3(1), 152–179. <https://doi.org/10.3390/cells3010152>
- Orr, P. M., Shank, B. C., & Black, A. C. (2017). The Role of Pain Classification Systems in Pain Management. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, 29(4), 407–418. <https://doi.org/10.1016/j.cnc.2017.08.002>
- Ossipov, M. H. (2012). The Perception and Endogenous Modulation of Pain. *Scientifica*, 2012, e561761. <https://doi.org/10.6064/2012/561761>
- Paek, J., Kalocsay, M., Staus, D. P., Wingler, L., Pascolutti, R., Paulo, J. A., Gygi, S. P., & Kruse, A. C. (2017). Multidimensional Tracking of GPCR Signaling via Peroxidase-Catalyzed Proximity Labeling. *Cell*, 169(2), 338–349.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.028>
- Pan, H.-L., Wu, Z.-Z., Zhou, H.-Y., Chen, S.-R., Zhang, H.-M., & Li, D.-P. (2008). Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 117(1), 141–161. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.09.003>
- Pathan, H., & Williams, J. (2012). Basic opioid pharmacology: An update. *British Journal of Pain*, 6(1), 11–16. <https://doi.org/10.1177/2049463712438493>
- Pedersen, N. P., Vaughan, C. W., & Christie, M. J. (2011). Opioid receptor modulation of GABAergic and serotonergic spinally projecting neurons of the rostral ventromedial medulla in mice. *Journal of Neurophysiology*, 106(2), 731–740. <https://doi.org/10.1152/jn.01062.2010>

Petäjä-Repo, U. E., Hogue, M., Laperrière, A., Bhalla, S., Walker, P., & Bouvier, M. (2001). Newly Synthesized Human  $\delta$  Opioid Receptors Retained in the Endoplasmic Reticulum Are Retrotranslocated to the Cytosol, Deglycosylated, Ubiquitinated, and Degraded by the Proteasome \*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(6), 4416–4423. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007151200>

Petäjä-Repo, U. E., Hogue, M., Leskelä, T. T., Markkanen, P. M. H., Tuusa, J. T., & Bouvier, M. (2006). Distinct Subcellular Localization for Constitutive and Agonist-modulated Palmitoylation of the Human  $\delta$  Opioid Receptor \*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(23), 15780–15789. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602267200>

Ponomarenko, E. A., Poverennaya, E. V., Ilgisonis, E. V., Pyatnitskiy, M. A., Kopylov, A. T., Zgoda, V. G., Lisitsa, A. V., & Archakov, A. I. (2016). The Size of the Human Proteome: The Width and Depth. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2016, 7436849. <https://doi.org/10.1155/2016/7436849>

Pradhan, A. A. A., Walwyn, W., Nozaki, C., Filliol, D., Erbs, E., Matifas, A., Evans, C., & Kieffer, B. L. (2010). Ligand-directed trafficking of the  $\delta$ -opioid receptor in vivo: Two paths toward analgesic tolerance. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(49), 16459–16468. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3748-10.2010>

Pradhan, A. A., Befort, K., Nozaki, C., Gavériaux-Ruff, C., & Kieffer, B. L. (2011). The delta opioid receptor: An evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(10), 581–590. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.06.008>

Qanbar, R., & Bouvier, M. (2003). Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacology & Therapeutics*, 97(1), 1–33. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(02\)00300-5](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00300-5)

Rau, K. K., Caudle, R. M., Cooper, B. Y., & Johnson, R. D. (2005). Diverse immunocytochemical expression of opioid receptors in electrophysiologically defined cells of rat dorsal root ganglia. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 29(4), 255–264. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2005.02.002>

*Regulation of  $\delta$ -Opioid Receptor Trafficking via  $\mu$ -Opioid Receptor Stimulation: Evidence from  $\mu$ -Opioid Receptor Knock-Out Mice* | *Journal of Neuroscience*. (n.d.). Retrieved July 11, 2021, from <https://www.jneurosci.org/content/23/12/4888>

Resh, M. D. (2006). Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. *Nature Chemical Biology*, 2(11), 584–590. <https://doi.org/10.1038/nchembio834>

Rhee, H.-W., Zou, P., Udeshi, N. D., Martell, J. D., Mootha, V. K., Carr, S. A., & Ting, A. Y. (2013). Proteomic Mapping of Mitochondria in Living Cells via Spatially-Restricted Enzymatic Tagging. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6125), 1328–1331. <https://doi.org/10.1126/science.1230593>

Roach, T. G., Lång, H. K. M., Xiong, W., Ryhänen, S. J., & Capelluto, D. G. S. (2021). Protein Trafficking or Cell Signaling: A Dilemma for the Adaptor Protein TOM1. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 643769. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.643769>

Rogers, E., Mehta, S., Shengelia, R., & Reid, M. C. (2013). Four Strategies for Managing Opioid-Induced Side Effects in Older Adults. *Clinical Geriatrics*, 21(4), <http://www.consultant360.com/articles/four-strategies-managing-opioid-induced-side-effects-older-adults>.

- Rozenfeld, R., & Devi, L. A. (2007). Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling:  $\beta$ -arrestin2-mediated ERK activation by  $\mu$ - $\delta$  opioid receptor heterodimers. *The FASEB Journal*, 21(10), 2455–2465. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7793com>
- Salim, K., Fenton, T., Bacha, J., Urien-Rodriguez, H., Bonnert, T., Skynner, H. A., Watts, E., Kerby, J., Heald, A., Beer, M., McAllister, G., & Guest, P. C. (2002). Oligomerization of G-protein-coupled Receptors Shown by Selective Co-immunoprecipitation \*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(18), 15482–15485. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201539200>
- Samama, P., Pei, G., Costa, T., Cotecchia, S., & Lefkowitz, R. J. (1994). Negative antagonists promote an inactive conformation of the beta 2-adrenergic receptor. *Molecular Pharmacology*, 45(3), 390–394.
- Sastri, M., Darshi, M., Mackey, M., Ramachandra, R., Ju, S., Phan, S., Adams, S., Stein, K., Douglas, C. R., Kim, J. J., Ellisman, M. H., Taylor, S. S., & Perkins, G. A. (2017). Sub-mitochondrial localization of the genetic-tagged mitochondrial intermembrane space-bridging components Mic19, Mic60 and Sam50. *Journal of Cell Science*, 130(19), 3248–3260. <https://doi.org/10.1242/jcs.201400>
- Sauvageau, E., Rochdi, M. D., Oueslati, M., Hamdan, F. F., Percherancier, Y., Simpson, J. C., Pepperkok, R., & Bouvier, M. (2014). CNIH4 Interacts with Newly Synthesized GPCR and Controls Their Export from the Endoplasmic Reticulum. *Traffic*, 15(4), 383–400. <https://doi.org/10.1111/tra.12148>
- Scherrer, G., Imamachi, N., Cao, Y.-Q., Contet, C., Mennicken, F., O'Donnell, D., Kieffer, B. L., & Basbaum, A. I. (2009). Dissociation of the Opioid Receptor Mechanisms that Control Mechanical and Heat Pain. *Cell*, 137(6), 1148–1159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.019>

- Schulz, R., Eisinger, D. A., & Wehmeyer, A. (2004). Opioid control of MAP kinase cascade. *European Journal of Pharmacology*, 500(1), 487–497. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.010>
- Scott, J. D., & Pawson, T. (2009). Cell Signaling in Space and Time: Where Proteins Come Together and When They're Apart. *Science*, 326(5957), 1220–1224. <https://doi.org/10.1126/science.1175668>
- Singer-Krüger, B., Fröhlich, T., Franz-Wachtel, M., Nalpas, N., Macek, B., & Jansen, R.-P. (2020). APEX2-mediated proximity labeling resolves protein networks in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *The FEBS Journal*, 287(2), 325–344. <https://doi.org/10.1111/febs.15007>
- Skolnick, P. (2018). The Opioid Epidemic: Crisis and Solutions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 58(1), 143–159. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010617-052534>
- Smart, D., & Lambert, D. G. (1996).  $\delta$ -Opioids Stimulate Inositol 1,4,5-Trisphosphate Formation, and so Mobilize  $\text{Ca}^{2+}$  from Intracellular Stores, in Undifferentiated NG108-15 Cells. *Journal of Neurochemistry*, 66(4), 1462–1467. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.66041462.x>
- Standifer, K. M., & Pasternak, G. W. (1997). G Proteins and Opioid Receptor-Mediated Signalling. *Cellular Signalling*, 9(3), 237–248. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(96\)00174-X](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(96)00174-X)
- St-Louis, É., Degrandmaison, J., Grastilleur, S., Génier, S., Blais, V., Lavoie, C., Parent, J.-L., & Gendron, L. (2017). Involvement of the coatamer protein complex I in the intracellular traffic of the delta opioid receptor. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 79, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2016.12.005>



Suer, M., & Sehgal, N. (2021). Taxonomy of Pain Terms and Syndromes. In M. Suer & N. Sehgal (Eds.), *Questions and Answers in Pain Medicine: A Guide to Board Exams* (pp. 3–8). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-68204-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-68204-0_1)

Syrovatkina, V., Alegre, K. O., Dey, R., & Huang, X.-Y. (2016). Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 428(19), 3850–3868. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.002>

Tao, Y.-X., & Conn, P. M. (2014). Chaperoning G Protein-Coupled Receptors: From Cell Biology to Therapeutics. *Endocrine Reviews*, 35(4), 602–647. <https://doi.org/10.1210/er.2013-1121>

Trapaidze, N., Gomes, I., Cvejic, S., Bansinath, M., & Devi, L. A. (2000a). Opioid receptor endocytosis and activation of MAP kinase pathway. *Molecular Brain Research*, 76(2), 220–228. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(00\)00002-4](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(00)00002-4)

Trapaidze, N., Gomes, I., Cvejic, S., Bansinath, M., & Devi, L. A. (2000b). Opioid receptor endocytosis and activation of MAP kinase pathway. *Molecular Brain Research*, 76(2), 220–228. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(00\)00002-4](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(00)00002-4)

Trapaidze, N., Gomes, I., Cvejic, S., Bansinath, M., & Devi, L. A. (2000c). Opioid receptor endocytosis and activation of MAP kinase pathway. *Molecular Brain Research*, 76(2), 220–228. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(00\)00002-4](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(00)00002-4)

Trinkle-Mulcahy, L. (2019). Recent advances in proximity-based labeling methods for interactome mapping. *F1000Research*, 8, 135. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16903.1>

- Trouvin, A.-P., & Perrot, S. (2019). New concepts of pain. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 33(3), 101415. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2019.04.007>
- Tuusa, J. T., Leskelä, T. T., & Petäjä-Repo, U. E. (2010). Human  $\delta$  opioid receptor biogenesis is regulated via interactions with SERCA2b and calnexin. *The FEBS Journal*, 277(13), 2815–2829. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07699.x>
- Wang, D., Raehal, K. M., Bilsky, E. J., & Sadée, W. (2001). Inverse agonists and neutral antagonists at  $\mu$  opioid receptor (MOR): Possible role of basal receptor signaling in narcotic dependence. *Journal of Neurochemistry*, 77(6), 1590–1600. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00362.x>
- Wang, D., Sun, X., Bohn, L. M., & Sadée, W. (2005). Opioid Receptor Homo- and Heterodimerization in Living Cells by Quantitative Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *Molecular Pharmacology*, 67(6), 2173–2184. <https://doi.org/10.1124/mol.104.010272>
- Wang, H.-B., Zhao, B., Zhong, Y.-Q., Li, K.-C., Li, Z.-Y., Wang, Q., Lu, Y.-J., Zhang, Z.-N., He, S.-Q., Zheng, H.-C., Wu, S.-X., Hökfelt, T. G. M., Bao, L., & Zhang, X. (2010). Coexpression of  $\delta$ - and  $\mu$ -opioid receptors in nociceptive sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(29), 13117–13122. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008382107>
- Wang, W., Loh, H. H., & Law, P.-Y. (2003). The Intracellular Trafficking of Opioid Receptors Directed by Carboxyl Tail and a Di-leucine Motif in Neuro2A Cells \*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 36848–36858. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301540200>

Wang, Z., Bilsky, E. J., Porreca, F., & Sadée, W. (1994). Accelerated communciation: Constitutive  $\mu$  opioid receptor activation as a regulatory mechanism underlying narcotic tolerance and dependence. *Life Sciences*, 54(20), PL339–PL350. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(94\)90022-1](https://doi.org/10.1016/0024-3205(94)90022-1)

Wells, A., & Grandis, J. R. (2003). Phospholipase C- $\gamma$ 1 in tumor progression. *Clinical & Experimental Metastasis*, 20(4), 285. <https://doi.org/10.1023/A:1024088922957>

Wermeling, D. P. (2015). Review of naloxone safety for opioid overdose: Practical considerations for new technology and expanded public access. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 6(1), 20–31. <https://doi.org/10.1177/2042098614564776>

Wettschureck, N., & Offermanns, S. (2005). Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions. *Physiological Reviews*, 85(4), 1159–1204. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2005>

Wickman, K., & Clapham, D. E. (1995). Ion channel regulation by G proteins. *Physiological Reviews*, 75(4), 865–885. <https://doi.org/10.1152/physrev.1995.75.4.865>

Wilson, M., Roll, J. M., Corbett, C., & Barbosa-Leiker, C. (2015). Empowering Patients with Persistent Pain Using an Internet-based Self-Management Program. *Pain Management Nursing*, 16(4), 503–514. <https://doi.org/10.1016/j.pmn.2014.09.009>

Wu, Y.-L., Pei, G., & Fan, G.-H. (1998). Inhibition of phospholipase C blocks opioid receptor-mediated activation of Gi proteins: *NeuroReport*, 9(1), 99–103. <https://doi.org/10.1097/00001756-199801050-00020>

- Xie, Y., Liu, Y.-K., Guo, Z.-P., Guan, H., Liu, X.-D., Xie, D.-F., Jiang, Y.-G., Ma, T., & Zhou, P.-K. (2020). RBX1 prompts degradation of EXO1 to limit the homologous recombination pathway of DNA double-strand break repair in G1 phase. *Cell Death & Differentiation*, 27(4), 1383–1397. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0424-4>
- Xu, Y., Nenortas, E., & Beckett, D. (1995). Evidence for Distinct Ligand-Bound Conformational States of the Multifunctional Escherichia coli Repressor of Biotin Biosynthesis. *Biochemistry*, 34(51), 16624–16631. <https://doi.org/10.1021/bi00051a010>
- Yang, J., Wu, J., Kowalska, M. A., Dalvi, A., Prevost, N., O'Brien, P. J., Manning, D., Poncz, M., Lucki, I., Blendy, J. A., & Brass, L. F. (2000). Loss of signaling through the G protein, Gz, results in abnormal platelet activation and altered responses to psychoactive drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(18), 9984–9989. <https://doi.org/10.1073/pnas.180194597>
- Zaki, P. A., Keith, D. E., Thomas, J. B., Carroll, F. I., & Evans, C. J. (2001). Agonist-, Antagonist-, and Inverse Agonist-Regulated Trafficking of the  $\delta$ -Opioid Receptor Correlates with, but Does Not Require, G Protein Activation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(3), 1015–1020.
- Zastrow, M. von, Svingos, A., Haberstock-Debic, H., & Evans, C. (2003). Regulated endocytosis of opioid receptors: Cellular mechanisms and proposed roles in physiological adaptation to opiate drugs. *Current Opinion in Neurobiology*, 13(3), 348–353. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(03\)00069-2](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(03)00069-2)
- Zheng, H., Pearsall, E. A., Hurst, D. P., Zhang, Y., Chu, J., Zhou, Y., Reggio, P. H., Loh, H. H., & Law, P.-Y. (2012). Palmitoylation and membrane cholesterol stabilize  $\mu$ -opioid receptor homodimerization and G protein coupling. *BMC Cell Biology*, 13(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-13-6>